

SÉRIE A, N° 3352

N° D'ORDRE :

4224

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Marise AYRAULT-JARRIER

1^{re} THÈSE : Action des détergents sur une β -lipoprotéine isolée
du sérum humain.

2^e THÈSE : Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 23 OCT. 1959, devant la Commission d'Examen :

M. WURMSER, *Président.*

Mme CHAIX

M. TONNELAT

} *Examineurs.*

IMPRIMERIE E. LANORD
22, RUE CHAUVELOT, PARIS-XV^e

1959

SÉRIE A, n° 3352

N° D'ORDRE :

4224

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Marise AYRAULT-JARRIER

1^{re} THÈSE : **Action des détergents sur une β lipoprotéine isolée
du sérum humain.**

2^e THÈSE : **Propositions données par la Faculté.**

Soutenues le , devant la Commission d'Examen :

M. WURMSER, *Président.*

Mme CHAIX

M. TONNELAT

} *Examineurs.*



IMPRIMERIE E. LANORD
22, RUE CHAUVELOT, PARIS-XV^e

1959

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen J. PÈRES

G. JULIA	T Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	QUENEY	T Météorologie et Dynamique atmosphérique.
FOCH	T Mécanique physique et expérimentale.	GALLIEN	T Embryologie.
DE BROGLIE ...	T Théories physiques.	EICHHORN	T Biol. vég. (S.P.C.N.).
PRENANT	T Anatomie et Histologie comparées.	DE CUGNAC	T Biol. vég. (S.P.C.N.).
PERES	T Mécanique des Fluides et applications.	M ^{lle} CAUCHOIS ..	T Chimie physique.
M. CURIE	T Physique (S.P.C.N.).	THELLIER	T Physique du Globe.
BARRABÉ	T Géol. struct. et Géol. appliquée.	L'HÉRITIER	T Génétique.
J. BOUCART	T Géogr. phys. et Géol. dynamique.	GRIVET	T Radioélectricité.
PLANTEFOL	T Botanique.	PONCIN	T Mécanique générale.
GRASSÉ	T Evolution des êtres organisés.	DUBREIL	T Arithmétique et théorie des nombres.
PREVOST	T Chimie organique.	QUELET	T Chimie organique.
BOULIGAND	T Application de l'analyse à la Géométrie.	CAGNIARD	T Géophys. appliquée.
CHAUDRON	T Chimie appliquée.	CHAMPETIER ...	T Chimie macromoléculaire.
WYART	T Minéralogie.	CUVILLIER	T Géologie structurale et Géologie appliquée.
TEISSIER	T Zoologie.	JUNG	T Pétrographie.
MANGENOT	T Biologie végétale.	TRILLAT	T Microscopie et diffraction électronique.
P. AUGER	T Physique quantique et relativité.	WIEMANN	T Chimie organique et structurale.
MONNIER	T Physiologie générale.	JACQUINOT	T Spectroscopie et Physique céleste.
PIVETEAU	T Paléontologie.	VASSY	T Physique de l'atmosphère.
ROCARD	T Physique (E.N.S.).	DESTOUCHES ..	T Théories physiques.
H. CARTAN	T Mathématiques (E.N.S.).	M. PRUVOST ..	T Géologie.
LAFFITTE	T Chimie générale.	AMIEL	T Chimie génér. (P.C.B.).
FAVARD	T Géométrie supérieure.	HOCART	T Minéralogie.
COULOMB	T Physique du Globe.	J.-P. MATHIEU ..	T Physique (P.C.B.).
M ^{lle} COUSIN ...	T Biologie animale (S.P.C.N.).	COUTEAUX	T Biol. animale (P.C.B.).
CHRÉTIEN	T Chimie minérale.	MAY	T Biol. animale (P.C.B.).
P. DRACH	T Zoologie.	CHOQUES	T Calcul différentiel et intégral.
KASTLER	T Physique (E.N.S.).	FELDMANN	T Biologie (P.C.B.).
EPHRUSSI	T Génétique.	GUINIER	T Physique des solides.
WURMSER	T Biologie physico-chimique.	JOST	T Physiologie comparée.
RIVIÈRE	T Géologie (S.P.C.N.).	FORTET	T Calcul des probabilités.
GAUTHERET	T Biol. végétale (P.C.B.).	SCHWARTZ	T Calcul différentiel et intégral.
LUCAS	T Recherches physiques.	CHOUARD	T Physiologie végétale.
A. THOMAS ...	T Biologie cellulaire.	MALAVARD	T Aviation.
ARNULF	T Optique appliquée.	BRELOT	T Calcul différentiel.
M. MORAND ...	T Enseignement de Physique.	NORMANT	T Chimie organique.
SOLEILLET	T Physique.	BÉNARD	T Chimie minérale.
FORTIER	T Mécanique expérimentale des fluides.	BUVAT	T Botanique (E.N.S.).
DANJON	T Astronomie.	DUGUÉ	T Statistiques mathém.
LAPORTE	T Physique générale et Radioactivité.	GELOSO	T Chimie (S.P.C.N.).
JANET	T Mécanique analytique et Mécanique céleste.	SOULAIRAC	T Psychophysiologie.
PETIT	T Biologie maritime.	ULRICH	T Physiologie végétale.
		MARÉCHAL	T Optique théorique et appliquée.
		KIRRMANN	T Théories chimiques.
		CHADEFAUD	T Botanique.
		DESTRIAU	T Physique (M.P.C.).

M ^{lle} LE BRETON. T	Physiologie générale.	LE ROLLAND	Mécanique des fluides.
SALEM	T Mathém. générales.	MICHEL André. T	Chimie (S.P.C.N.).
LELONG	T Mathém. générales.	OLMER	T Energétique générale.
DEVILLERS	Anatomie et Histologie comparées.	ROUAULT	T Physique générale.
EHRESMANN	T Topologie algébrique.	GAUTHIER	T Mécanique appliquée.
FRANÇON	T Physique (S.P.C.N.).	BACHEWITZ ..	Chimie physique.
GLANGEAUD	T Géographie phys. et et Géologie dynam.	BROSSEL	Physique atomique.
CODEMENT	T Mathémat. (M.P.C.).	BUSER	Biol. animale (P.C.B.).
PISOT	T Calcul des probabilités	CAMUS	Biol. végétale (P.C.B.).
ROCH E.	T Géologie.	CASTAING	Physique générale.
SCHATZMANN ...	Astrophysique.	CURIEN	Minéralogie et Cristallographie.
TERMIER	T Paléontologie stratigr.	MOYSE	Physiologie végétale.
ZAMANSKY	T Mathém. générales.	NOIROT	Evolution des êtres organisés.
LENNUIER	Physique (M.G.P.).	PANNETIER	Chimie (S.P.C.N.).
RIZET	Génétique.	POSSOMPES ...	Biol. animale (P.C.B.).
ROUTHIER	Géologie appliquée.	PULLMANN	Chimie théorique.
M ^{me} TONNELAT . T	Théories physiques.	TEILLAC	Physique nucléaire et Radioactivité.
DIXMIER	T Mathémat. (M.P.C.).	TONNELAT	Biologie physico-chim.
SOUGHAY	T Chimie générale.	VILLE	Econométrie.
AIGRAIN	T Electrotechnique.	WILLEMART ...	Chimie (P.C.B.).
ERUSSET	Chimie minérale.	DODÉ	T Chimie.
M. LEVY	Physique théorique.	FREYMANN	T Physique (S.P.C.N.).
M ^{me} CHAIX	Chimie biologique.	GUINOCHET	T Biol. végétale (Orsay).
M ^{me} HUREL-PY. Biol.	végét. (P.C.B.).	ROLLET	T Chimie (P.C.B.).
PIAUX	Chimie (P.C.B.).	M ^{lle} JOSIEN	T Chimie (P.C.B.).
BRUN	Mécanique expérimentale des fluides.	CHEVALLEY	T Géométrie algébrique et théorie des groupes.
LEDERER	T Chimie des substances organiques naturelles.	ARNOULT	T Physique (Orsay).
M ^{me} DUBREUIL . T	Mathématiques.	CHAPELLE	T Physique (P.C.B.).
M ^{me} LELONG ... T	Mathémat. (E.N.S.).	DELANGE	T Mathémat. (Orsay).
BELLAIR	T Géologie (S.P.C.N.).	DENY	T Mathémat. (Orsay).
COTTE	T Physique (M.P.C.).	GERMAIN P. ...	T Mécanique théor. des fluides.
DUBOIS J.-E. ..	T Chimie (S.P.C.N.).	LUCAS G.	T Géologie.
LAMOTTE	Zoologie (E.N.S.).		

Secrétaire général C. MONIER

AVANT-PROPOS

Cet ouvrage est dédié en témoignage de reconnaissance et de respectueuse affection à la mémoire de Monsieur Michel MACHEBOEUF. Il m'a guidé dans l'orientation de mes études, et m'a toujours accordé son appui affectueux. C'est à lui que je dois l'idée initiale de ce travail. Son enthousiasme scientifique et son exemple m'ont été un soutien au cours de ces dernières années.

Je remercie Monsieur Jacques POLONOVSKI qui m'a aidée à suivre le chemin tracé. Son accueil dans son laboratoire, ses conseils et son amitié m'ont été un encouragement précieux et une aide efficace. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude et de mon attachement.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur WURMSER, qui m'a encouragé tout au long de la réalisation de ce travail et qui a accepté de présider le jury de ma thèse.

J'exprime également ma gratitude à Madame CHAIX, qui a jugé ce travail avec toute sa bienveillance, et à Monsieur TONNELAT, pour les conseils si utiles qu'il m'a prodigués et l'intérêt amical qu'il a porté à mes recherches.

Je n'oublie pas tous les camarades qui m'ont aidée au cours de ces années et dont la sympathie a créé au laboratoire une agréable ambiance de travail.

INTRODUCTION

Isolement des lipoprotéines.

Le sérum sanguin est un milieu aqueux parfaitement limpide et homogène bien qu'il contienne 5 à 8 grammes par litre de lipides. Le maintien à l'état dispersé des lipides dans ce milieu s'explique par l'existence d'associations moléculaires entre les lipides et les protides du sérum.

Machebœuf, en 1929 ⁽³⁹⁾, mit en évidence ces associations lipidoprotéiques en isolant du sérum de cheval une fraction protéique particulièrement riche en lipides. Cette fraction, parfaitement soluble dans l'eau à pH supérieur à 6,5, fut appelée « cénapse acido-précipitable ».

En 1949, Gofman, Lindgren et Elliott ⁽²⁴⁾ établirent l'existence de plusieurs lipoprotéines par ultracentrifugation fractionnée. Le procédé est fondé sur le travail de Pedersen ⁽⁶¹⁾ qui avait indiqué la différence de densité des protéines et des lipoprotéines contenues dans le sérum.

Lewis et Page ⁽³⁸⁾ donnèrent une première classification de ces fractions à partir d'un milieu de densité 1,21 (milieu où les protéines du sérum tombent au fond du tube de centrifugation tandis que les lipoprotéines plus légères remontent à la surface) et définirent leur constante de sédimentation négative — $S_{1,21}$.

En 1954, Gofman et de Lalla ⁽²²⁾ classèrent les lipoprotéines en deux groupes très distincts correspondant d'ailleurs à la classification électrophorétique en β - et α -lipoprotéines (Blix, Tiselius et Svensson) ⁽⁶⁾ :

I. — Les lipoprotéines de faible densité (LDL) : définies par leur vitesse de flottation (sédimentation négative) dans un milieu de densité 1,063 ($S_{1,063}$) et distribuées en cinq groupes.

II. — Les lipoprotéines de densité élevée (HDL) : définies par leur vitesse de flottation dans un milieu de densité 1,21 et réparties en trois groupes.

Ces groupes sont énumérés dans le tableau suivant :

CATÉGORIE		CONSTANTE DE FLOTTATION	DENSITÉ
β -lipoprotéines	LDL 1	$S_{1,063} > 400$	$d < 1,018$
	LDL 2	$S_{1,063} \quad 100-400$	
	LDL 3	$S_{1,063} \quad 20-100$	
	LDL 4	$S_{1,063} \quad 12-20$	$d = 1,035$
	LDL 5	$S_{1,063} \quad 2-12$	
α -lipoprotéines	HDL 1	$S_{1,125} > 0$	$d = 1,05$
	HDL 2	$S_{1,125} > 0$	$d = 1,075$
	HDL 3	$S_{1,210} > 0$	$d = 1,145$

Vers la même époque, de nombreux auteurs étudièrent les lipoprotéines en utilisant la méthode d'électrophorèse : sur papier, Swahn ⁽⁷⁵⁾ et Rebeyrotte ⁽⁶⁷⁾ (coloration des lipides au noir Soudan et au red oil O) ; sur amidon, Kunkel ⁽³⁷⁾ (découpage et élution du support) ; sur gélose, Grabar ⁽⁸¹⁾ (par électrophorèse et surtout par immunoélectrophorèse) ⁽⁸²⁾.

Plusieurs techniques de séparation furent proposées pour isoler les différentes lipoprotéines, faisant intervenir des précipitations par des réactifs chimiques.

J. Polonovski ⁽⁶²⁾, en 1949, a utilisé le zéphirol pour précipiter électivement une lipoprotéine du sérum qu'il obtient dénaturée. Oncley ⁽⁵⁷⁾, en 1950, utilisant la technique du fractionnement par les solvants organiques de Cohn et ensuite l'ultracentrifugation, a isolé le premier une β -lipoprotéine soluble. Russ, Eder et Barr ⁽⁶⁸⁾ ont proposé un schéma de fractionnement plus rapide mais analogue. Beaucoup plus récemment, Sandor et Slizewicz ont isolé ⁽⁶⁹⁾ une lipoprotéine pure par ultracentrifugation des précipités d'euglobulines III obtenus par dialyse et dilution du sérum. Burstein ⁽¹⁰⁾ obtient également d'une façon relativement simple la totalité des β -lipoprotéines par précipitation du sérum avec l'héparine ou le sulfate de dextrane (en présence d'ions Ca^{+}).

Mais toutes ces méthodes font intervenir des phénomènes chimiques pouvant amener une altération de quelques-unes des liaisons lipoprotéiniques ou même modifier la composition des lipoprotéines. D'autre part, elles n'ont pas les qualités de fractionnement que nous reconnaissons aux procédés de flottation.

Parallèlement aux travaux de Gofman, de Lalla et Lindgren ^(23 - 25), de Havel, Eder et Bragdon ⁽³¹⁾, de Hillyard, Entenman, Feinberg et Chaikoff ⁽³²⁾, nous avons nous-mêmes ⁽⁶⁴⁾ fractionné les lipoprotéines du sérum humain selon le tableau suivant. Chaque fraction peut être obtenue au moyen de deux ultracentrifugations successives dans des milieux de densité déterminée de façon que la lipoprotéine sédimente dans le premier et flotte dans le second.

DENSITÉ DU MILIEU		
Sédimentation	Flottation	
	1,019	β -lipoprotéines légères $S_{f\ 1,063} > 12$
1,019	1,063	β -lipoprotéines $S_{f\ 1,063} 0 \text{ à } 12$
1,063	1,100	HDL 1 et HDL 2
1,100	1,15	α -lipoprotéines proprement dites de densité 1,14 (HDL 3)
1,15	1,21	α -lipoprotéines lourdes
1,21		Lipido-protéines qui constituent 10 p. 100 des lipides et qui sédimentent avec les protéines

Etat physico-chimique des lipides.

L'état physico-chimique des lipides dans le sérum a fait l'objet de nombreuses recherches. Dès 1870, Hoppe-Seyler ⁽³³⁾ remarquait que les lipides n'étaient pas extraits par agitation du sérum avec de l'éther. Plus tard,

Hardy et Gardiner ⁽³⁰⁾ arrivèrent à délipider le sérum par un mélange alcool-éther à — 5° sans dénaturer l'ensemble des protéines. Les lipides principalement constitués de cholestérol, stérides, glycérides et phospholipides ainsi isolés ne sont plus solubles dans l'eau. Bien que les phospholipides soient hydrophiles, ils ne suffisent pas à solubiliser les autres lipides. La fraction protéinique est donc essentielle pour maintenir les lipides en solution aqueuse.

Plusieurs hypothèses furent faites pour essayer d'expliquer le mode d'association des protéines et des lipides. Machebœuf et ses collaborateurs ⁽⁴⁷⁾ pensèrent que, parmi les forces de liaisons possibles entre ces constituants, nous pouvions considérer, d'une part, les forces de Van der Waals entre les chaînes polyméthyléniques des lipides et les acides aminés aliphatiques neutres des protéines (valine, leucine, phénylalanine), d'autre part, les attractions ioniques entre les fonctions polaires des lipides et celles des protéines. A la suite de Machebœuf, Oncley, en 1953 ⁽⁵⁸⁾, a donné une image schématique de la forme de la molécule lipoprotéinique où les phospholipides servaient de liens entre un noyau lipidique et une enveloppe protéinique. Les recherches de Dervichian ⁽³⁻¹³⁾ et de Tayeau ⁽⁷⁸⁻⁷⁹⁾ ont précisé d'autre part les possibilités d'associations moléculaires entre lipides (associations stœchiométriques cholestérol-lécithine fondées sur les forces de Van der Waals entre groupements apolaires) et les modes de liaisons possibles entre lécithine et protéine (liaison électrovalentielle entre fonctions ionisées acides ou, plus probablement, basiques de la protéine et les fonctions d'ionisation inverse ammonium quaternaire ou, surtout, acide phosphorique de la lécithine).

Les lipoprotéines qui ont été isolées se présentent comme des molécules, à peu près sphériques, hydratées, dont les fonctions hydrophiles appartiennent aux chaînes protéiniques et aux phospholipides. Le calcul montre que la quantité totale de protéine est insuffisante pour couvrir la surface de la molécule. Il est donc très vraisemblable que la couche externe comporte à la fois protéines et lipides hydrophiles, les autres lipides se trouvant rassemblés vers l'intérieur.

Action des détergents sur les lipoprotéines.

L'emploi des détergents a apporté une contribution extrêmement précieuse à cette étude des associations lipoprotéiniques.

En 1932, avec Sandor, Machebœuf ⁽⁴⁷⁾ avait montré que l'addition de petites quantités d'alcool (6 à 10 p. 100) permet à l'éther d'extraire 50 p. 100 des lipides du sérum. Machebœuf et Tayeau ⁽⁴⁸⁻⁴⁹⁾ firent agir sur le sérum des savons d'acide gras très solubles dans l'eau ; en présence de ces savons anioniques alcalins, l'éther entraîne une partie importante des lipides sériques : du cholestérol, des stérides, des glycérides et des phospholipides. En 1941, Tayeau a observé le décollement sélectif du cholestérol seul en utilisant le saponoside du *Sapindus Mukorosi* ⁽⁷⁶⁾ : ce saponoside stéroïdique présente une analogie de structure avec le cholestérol. Les sels biliaires ⁽⁷⁷⁾ possèdent aussi le pouvoir de dissocier le cholestérol des lipoprotéines ; de même le dihydroabiétate de sodium (Machebœuf, Rebeyrotte) ⁽⁴⁵⁾ dont la constitution présente une parenté de structure avec le cholestérol. J. Polonovski ⁽⁴⁴⁻⁶²⁾ a montré

que les saponiums (savons cationiques) décollent eux aussi le cholestérol sérique. A la suite de toutes ces observations mettant en évidence la substitution d'une substance lipidique par des substances de structure voisine, Machebeuf a émis son hypothèse sur le déplacement icéломorphique ⁽⁴⁰⁾ : le détergent décollerait les lipides en prenant leur place grâce à sa structure stérique presque identique.

BUT DU TRAVAIL.

Toutes ces hypothèses sur les associations lipides-protéines ont été faites à la suite de travaux effectués sur l'action des détergents sur les cénapses au sein du sérum.

Il est difficile d'en tirer des conclusions sur les modifications de structure des lipoprotéines individuelles en raison des interactions multiples que peuvent présenter les autres protéines sériques avec les détergents ou avec les constituants des lipoprotéines. Il nous a paru nécessaire de reprendre une partie de ces travaux sur les lipoprotéines isolées et purifiées afin de pouvoir ainsi analyser plus spécifiquement l'action des détergents sur les associations lipoprotéiniques. Nous savons aujourd'hui que la plupart des structures intracellulaires sont également lipoprotéiniques et l'utilisation des détergents se répand de plus en plus pour leur fractionnement et leur étude. Là encore le biochimiste a besoin de connaître l'action exercée par ces réactifs sur les lipoprotéines.

Notre travail a donc porté d'abord sur l'obtention d'une lipoprotéine pure et ensuite sur le mode d'action des différents détergents.

1° Isolement d'une β -lipoprotéine bien définie.

Nous avons recherché la méthode la mieux appropriée pour fractionner le sérum humain et obtenir une β -lipoprotéine sans altérer l'association moléculaire de cette fraction.

2° Détermination de la pureté de cette fraction et étude de sa constitution.

Nous avons mis en œuvre les différentes méthodes classiques d'étude d'une protéine (ultracentrifugation analytique, électrophorèse, immuno-chimie). Nous avons analysé sa composition chimique et nous en avons étudié la stabilité.

3° Etude des associations lipoprotéines-détergents.

L'influence de détergents anioniques (oléate de sodium, cholate de sodium) et de détergents cationiques (zéphirol) a été étudiée par les différentes méthodes suivantes : électrophorèse, ultracentrifugation, diffusion de la lumière et détermination de l'extractibilité des lipides par l'éther.

PRÉPARATION DE LA β -LIPOPROTÉINE

En nous fondant sur les différences de densité des diverses lipoprotéines et des protéines du sérum humain, nous avons isolé une lipoprotéine bien définie par deux ultracentrifugations successives :

Une première centrifugation nous permet d'isoler les lipoprotéines légères en les faisant flotter dans une solution de densité 1,063 (technique de Gofman et ses collaborateurs) permettant de les séparer des lipoprotéines lourdes et des autres protéines du sérum qui, dans ce milieu, sédimentent vers le fond du tube ;

Une deuxième centrifugation des lipoprotéines légères précédemment obtenues, effectuée dans un milieu de densité 1,019, nous donne deux fractions : les β -lipoprotéines les plus légères remontent à la partie supérieure du tube tandis que les β -lipoprotéines principales sédimentent au fond.

Cette séparation permet d'obtenir la fraction des β -lipoprotéines dont le $S_{f\ 1,063}$ est compris entre 0 et 12, dont la densité est comprise entre 1,019 et 1,063, débarrassée de toutes les autres fractions lipoprotéiniques du sérum.

Pour ce travail, nous avons utilisé une ultracentrifugeuse Spinco, modèle L, avec un rotor 40,0 permettant de centrifuger 120 ml de sérum d'un même donneur (les sérums nous ont été fournis par le Centre de Transfusion Sanguine; presque tous les sangs étudiés étaient du groupe A). Durant la centrifugation, la chambre du rotor est maintenue à la température de 10°.

La densité du sérum mesurée pour chaque donneur varie entre 1,025 et 1,028. La valeur désirée de la densité du milieu de centrifugation est obtenue par l'addition de solutions salines. Nous avons donc préparé deux solutions mères, l'une concentrée en sels contient 153 g de chlorure de sodium et 354 g de bromure de potassium par litre, l'autre contient 8,77 g de chlorure de sodium par litre (solution 0,15 M).

La densité de ces solutions est vérifiée à 20° pour chaque expérience : celle de la première est comprise entre 1,336 et 1,338, celle de la deuxième est comprise entre 1,0053 et 1,0059.

Première centrifugation.

Les tubes du rotor 40,0 étant d'environ 12 ml, nous plaçons dans chacun des 12 tubes du rotor 10 ml de sérum et la quantité B de solution mère concentrée calculée d'après l'équation :

$$(10 \times d_{\text{sérum}}) + (B \times d_{\text{mère}}) = (10 + B) 1,063.$$

Cette quantité est généralement comprise entre 1,35 et 1,38 ml.

Les tubes ainsi remplis sont bouchés hermétiquement et leurs contenus mélangés par retournement une dizaine de fois.

Placés dans le rotor, ils sont centrifugés 20 heures à 40.000 t/mn,

vitesse correspondant à une accélération de 105.000 g pour le rayon moyen. Après centrifugation, les tubes sont retirés avec soin du rotor pour éviter le mélange des différentes fractions; chaque tube contient 4 couches successives en allant du haut du tube vers le fond.

A couche jaune d'environ 1 cm.

A' couche incolore d'environ 3 cm.

B couche jaune d'environ 1 à 2 cm.

C couche rougeâtre fond du tube.

L'électrophorèse nous montre que les β -lipoprotéines sont dans la couche A, la couche A' contenant des traces de ces β -lipoprotéines diluées traînant sur le papier. Les α -lipoprotéines se trouvent dans la couche B avec un peu de protéines, tandis que la couche C contient le reste des protéines et les lipidoprotéines du sérum.

Deuxième centrifugation.

La solution précédente A de densité 1,063 prélevée dans chacun des 12 tubes centrifugés, est amenée à la densité de 1,019 par dilution avec la solution mère de ClNa 0,15 M ($d=1,0059$), d'après l'équation :

$$(A_{ml} \times 1,063) + (B_{ml} \times 1,0059) = (A_{ml} + B_{ml}) 1,019$$

Connaissant le volume A, nous en déduisons B.

Après centrifugation 17 heures à 40.000 t/mn dans le rotor 40,0, c'est-à-dire à 105.000 g , on prélève à la seringue la couche supérieure (opalescente), soit environ 1 cm, puis la couche intermédiaire incolore jusqu'à environ 1,5 à 2 cm du fond du tube. Les parois du tube sont alors essuyées avec soin pour éviter une contamination des β -lipoprotéines par les autres fractions restées sur ces parois. Par de légères agitations, la fraction du fond du tube est remise en solution et décantée dans une éprouvette graduée pour en mesurer le volume.

Une électrophorèse sur papier montre que la couche supérieure est constituée de β -lipoprotéines légères migrant peu et que la fraction isolée au fond du tube est une β -lipoprotéine homogène (voir fig. 1).

Cette fraction de densité comprise entre 1,019 et 1,063 est la β -lipoprotéine de Gofman dont la constante de flottation $S_{1,063}$ est comprise entre 0 et 12. La solution obtenue est jaune clair, limpide. Elle est diluée avec une solution de densité 1,019 préparée à partir des solutions mères de densité $d=1,337$ et $d=1,0059$, pour être amenée à un volume tel que 1 ml de solution correspond à 5 ml de sérum. C'est cette solution qui servira dans les diverses études de cette fraction.

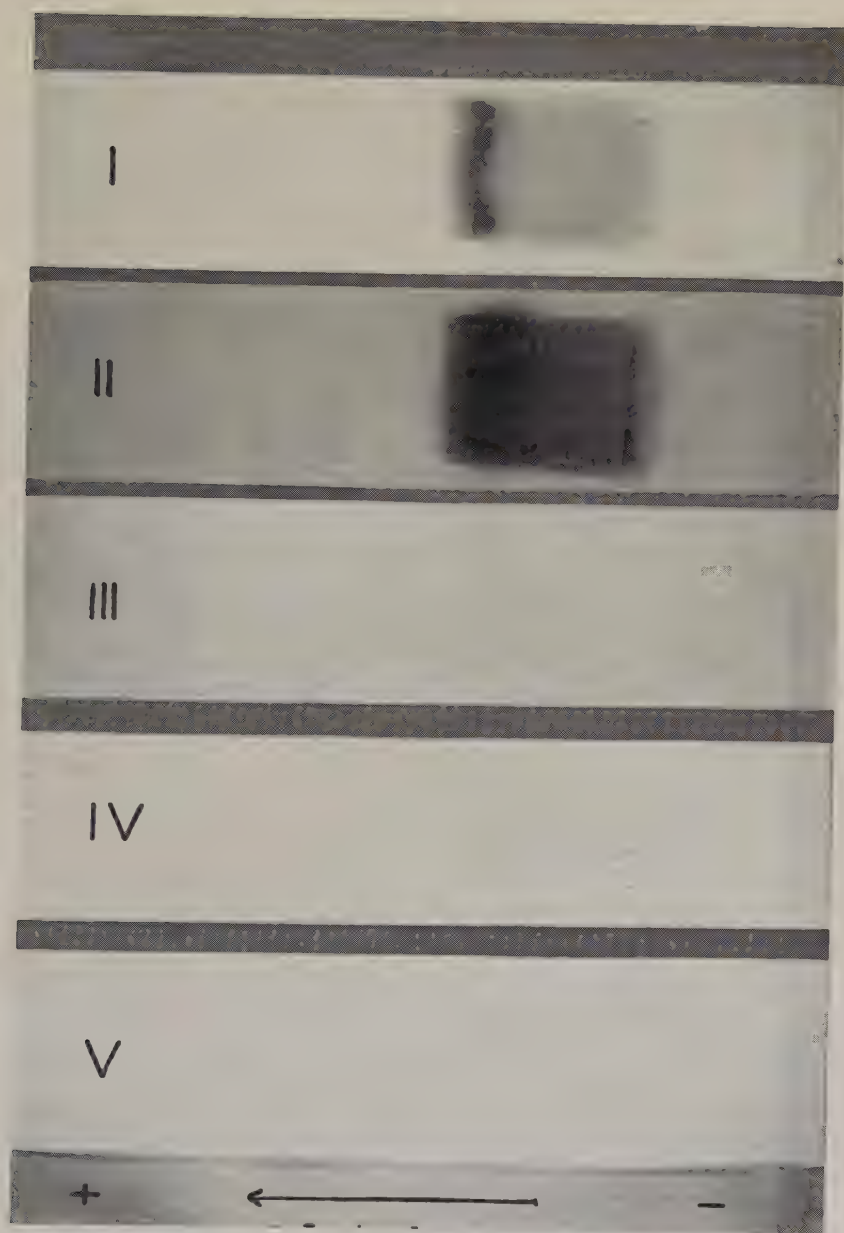


FIG. 1. — Electrophorèse sur papier Arches 304.
Tampon véronal pH 8,6 - 4 h. - 10 V/cm - dépôt 20 μ l de solution β -L.P.
I, II, III, IV, V, voir page 14.

PROPRIETES ET CONSTITUTION DE LA β -LIPOPROTEINE ISOLEE

Nous désignerons par β -LP cette fraction isolée entre les densités 1,019 et 1.063.

ELECTROPHORESE.

α) **Electrophorèse sur papier.**

Chaque électrophorèse est effectuée en déposant 20 μ l de solution par bande de 2 cm de large dans l'appareil Lérès (⁴⁶). Le tampon utilisé est un tampon véronal à pH 8,6 de force ionique 0,05. Après 4 heures de course sous une tension de 10 volts/cm et une intensité de 18 mA nous retirons le papier du bac d'électrophorèse ; une bande (I) est plongée encore humide dans un révélateur des protéines (solution alcoolique de bleu de bromophénol saturée en chlorure mercurique) (¹⁷), les autres bandes sont séchées rapidement à l'étuve à 100°. Deux de ces bandes sont colorées avec le révélateur des lipides (solution alcoolique de noir Sudan (⁷⁵), une fois séchée une de ces bandes (III) est lavée par l'acétone (⁶⁵). Une quatrième bande (IV) colorée par le réactif de Schiff suivant la méthode de Biserte (¹) révélera les polysaccharides tandis que, sur la dernière bande (V), la coloration après vaporisation de ninhydrine (¹¹) mettra en évidence les peptides ; la figure 1 nous montre que la β -LP se comporte comme une protéine homogène pauvre en protides et riche en lipides, contenant également des polysaccharides. *La β -LP est donc une glucolipoprotéine.*

β) **Electrophorèse en veine liquide** (fig. 2).

Notre appareil est celui de Tiselius (⁸⁰) utilisant le dispositif optique de Philpot et Svensson modifié par Moore et White (⁵⁶).

Nous avons déterminé la mobilité de la β -LP à différents pH ; 3 ml de l'échantillon à étudier (concentration 20 mg/ml) sont mis à dialyser 14 heures contre le tampon choisi, à l'intérieur d'un compartiment intermédiaire protéique (sérum humain) déjà en équilibre avec le tampon par une dialyse de 24 heures (voir étude de la stabilité de la β -LP).

1° *Calcul de la mobilité à pH 8,6.*

Le tampon utilisé est le tampon véronal acide-véronal sodé, de force ionique $\Gamma=0,05$. La fraction étant placée dans une cellule de conductivité à électrodes de platine de constante K_c , étalonnée à l'aide d'une solution de ClK 0,01 M, nous mesurons la résistance en Ω /cm de l'échantillon avec un pont de Wheatstone et nous déduisons la conductibilité. L'électrophorèse est faite sous une tension d'environ 155 volts et nous fixons l'intensité à 5,5 mA.

La mobilité peut être calculée d'après l'équation :

$$\mu = \frac{A \cdot K \cdot d}{I \cdot m \cdot t}$$

A = section du tube en U = 0,3 cm²

m = facteur d'agrandissement du système optique = 1,06

$$K = \text{conductibilité de la solution} = \frac{K_c}{R} = \frac{0,98}{528}$$

I = intensité en ampères = 5,5 · 10⁻³

Le calcul de la mobilité est fait pour la branche descendante de la cel-

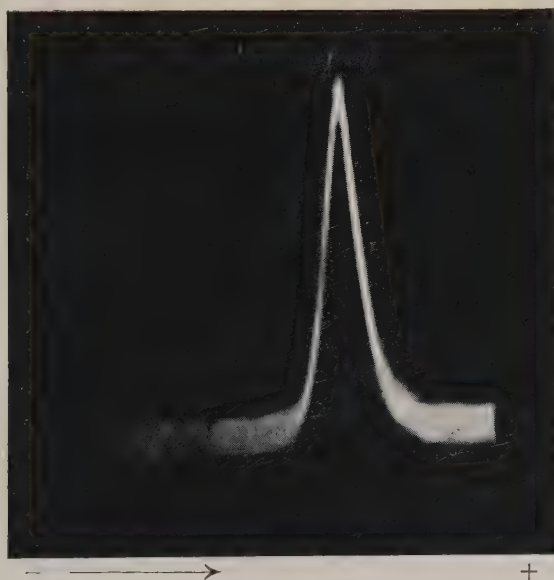


FIG. 2 — Electrophorèse en veine liquide.

Tampon phosphate pH = 7. Frontière descendante après 7200 secondes de course.

lule à deux temps de course d'électrophorèse t_1 et t_2 donnant les déplacements d_1 et d_2 de la fraction :

$$t_1 = 6.180 \text{ secondes}$$

$$d_1 = 2,45 \text{ cm}$$

$$\mu_1 = 3,74 \cdot 10^{-5} \text{ cm/s/v/cm}$$

$$t_2 = 9.000 \text{ secondes}$$

$$d_2 = 3,55 \text{ cm}$$

$$\mu_2 = 3,76 \cdot 10^{-5} \text{ cm/s/v/cm}$$

2° Calcul des mobilités à différents pH.

Les tampons utilisés sont les suivants :

pH 7 (phosphate monopotassique, phosphate disodique)	$\Gamma = 0,05$
pH 5,9 (acide acétique, acétate de sodium)	$\Gamma = 0,047$
pH 5,6 (acide acétique, acétate de sodium)	$\Gamma = 0,044$
pH 4,4 (acide acétique, acétate de sodium)	$\Gamma = 0,033$
pH 3,8 (acide acétique, acétate de sodium)	$\Gamma = 0,03$

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant, la mobilité moyenne étant calculée à partir des mobilités à deux temps de course de l'électrophorèse pour la branche descendante de la cellule en U.

	pH 7	pH 5,9	pH 5,6	pH 4,4	pH 3,8
Voltage (volt)	175	150	160	175	200
Intensité (ampère) ..	$5,5 \cdot 10^{-3}$	$5,5 \cdot 10^{-3}$	$5,5 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-3}$
Résistance (Ω /cm) ...	594	529	545	644	731
t_1 (seconde)	3.840	4.680	4.680	3.540	2.400
d_1 (cm)	1,5	0,3	0,15	2,35	2,95
μ_1 (cm/s/v/cm)	$3,29 \cdot 10^{-5}$	$0,61 \cdot 10^{-5}$	$0,29 \cdot 10^{-5}$	$5,71 \cdot 10^{-5}$	$9,28 \cdot 10^{-5}$
t_2 (seconde)	7.200	6.540	8.520	5.700	—
d_2 (cm)	2,85	0,4	0,25	3,72	—
μ_2 (cm/s/v/cm)	$3,36 \cdot 10^{-5}$	$0,59 \cdot 10^{-5}$	$0,26 \cdot 10^{-5}$	$5,61 \cdot 10^{-5}$	—
μ moyen	$3,32 \cdot 10^{-5}$	$0,60 \cdot 10^{-5}$	$0,27 \cdot 10^{-5}$	$5,66 \cdot 10^{-5}$	$9,28 \cdot 10^{-5}$

La courbe (fig. 3) des mobilités en fonction du pH nous permet de définir le point isoélectrique de notre β -LP qui se situe aux environs de **5,7**.

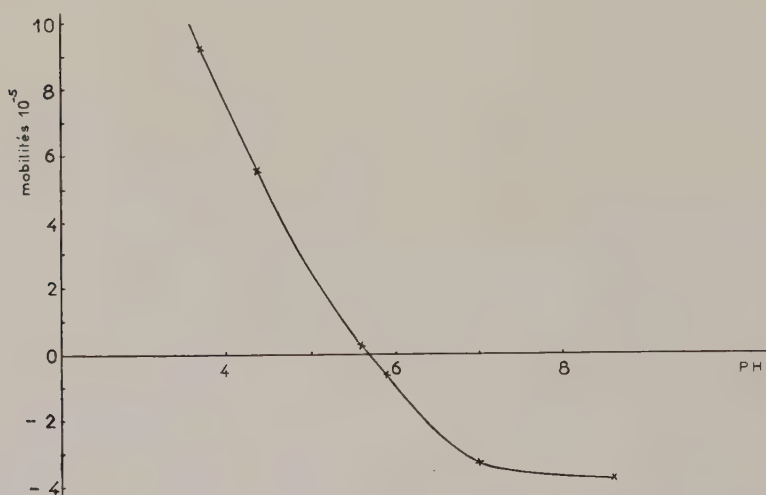


FIG. 3. — Variation de la mobilité de la β -LP en fonction du pH.
 pH=8,6 - tampon véronal ;
 pH=7,6 - tampon phosphate ;
 pH < 6,0 - tampon acétate.

c) Electrophorèse sur amidon.

La β -LP est déposée sur un papier ou incorporée dans un peu d'amidon soluble ; elle est alors introduite dans un gel d'amidon préparé suivant la méthode de Smithies ⁽⁷²⁾ mise au point dans notre laboratoire pour l'étude des lipoprotéines ⁽⁶⁶⁾. Soumise à une tension de 80 volts avec une intensité de 4mA pendant 16 heures, la β -LP se déplace légèrement dans

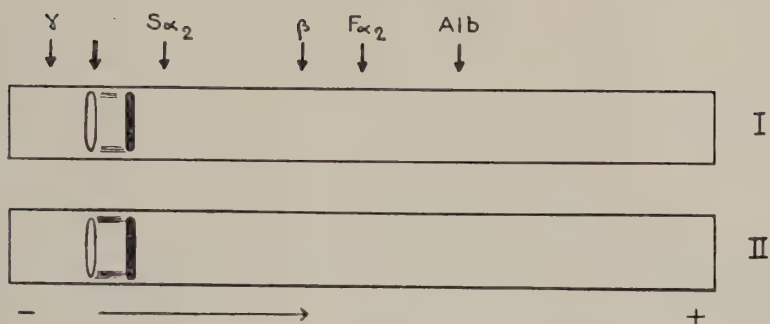


FIG. 4. — Electrophorèse sur gel d'amidon ; tampon borate pH 8,4 - 16 h. - 4 V/cm
dépôt 100 μ l de solution de β -LP.

I. — Coloration au noir amide ;
II. — Coloration au noir Soudan.

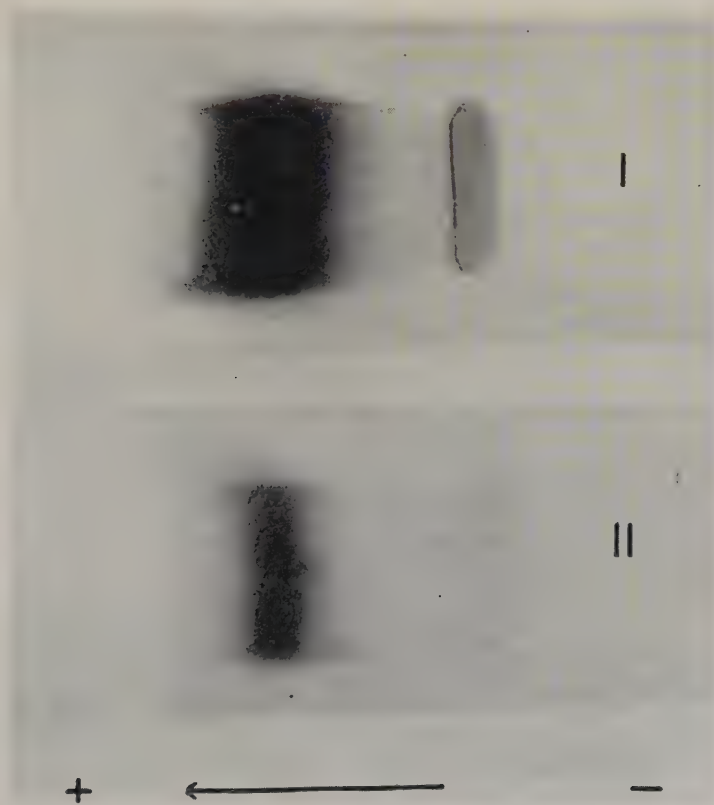


FIG. 5. — Electrophorèse sur gélose ; tampon véronal pH 8,2.

I. — Coloration au noir Soudan ;
II. — Coloration au noir amide.

le gel d'amidon donnant une bande fine colorable au noir amide (Amidoschwartz 10 B) et au noir Soudan (fig. 4) située entre les γ -globulines et les α_2 -globulines lentes (S_{α_2}).

d) Electrophorèse sur gélose.

Nous avons suivi la migration de la β -LP sur un support de gélose suivant la méthode d'Uriel et Grabar ⁽⁸¹⁾. Nous obtenons comme pour les électrophorèses précédentes une seule bande, caractéristique, faible en

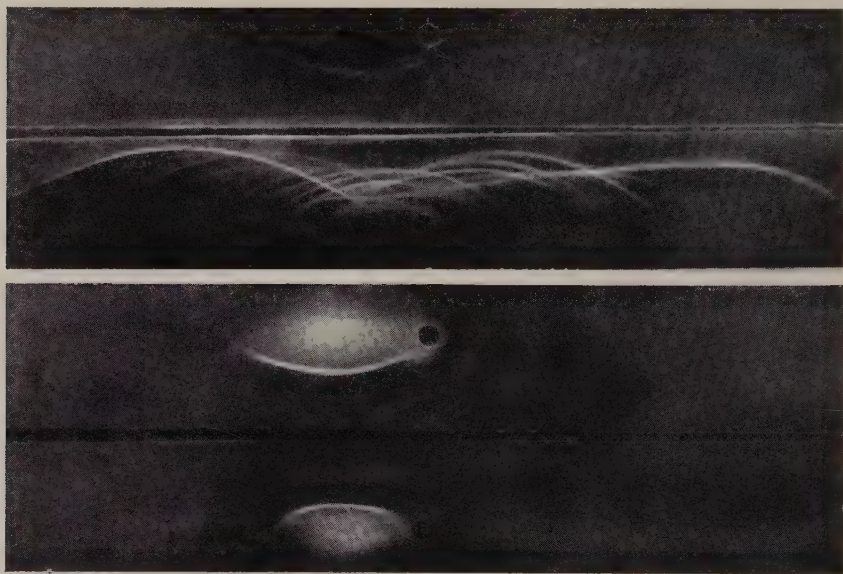


FIG. 6. — Immunoélectrophorèse de la β -LP vis-à-vis du sérum humain normal, dans la fente le sérum de Cheval anti-humain normal N° 491.

En haut : coloration au noir amide;

En bas : coloration au noir Soudan.

protides et très concentrée en lipides (fig. 5). L'immunoélectrophorèse contre un sérum de Cheval anti-sérum humain total met en évidence une seule ligne de précipitation, colorable par le noir amide et le noir Soudan. Cette ligne est située dans la même zone que la β -lipoprotéine dans le sérum humain comme nous pouvons le voir sur la figure 6. L'épuisement de l'immunsérum par la β -LP amène d'ailleurs la disparition d'une seule ligne, celle des β -lipoprotéines (fig. 7).

e) Etude immunologique.

Afin de mieux caractériser cette fraction par l'étude immunologique, nous avons préparé un sérum de Lapin anti- β -LP en immunisant l'animal

avec notre fraction β -LP. Pour cela, on inocule à l'animal une solution isotonique de β -lipoprotéine à 1 mg de protéine par ml, en deux séries de piqûres à 1 mois d'intervalle. Chaque série comprend 8 injections intra-veineuses tous les deux jours; les 4 premières piqûres de chaque série sont de 0,5 ml, les 4 piqûres suivantes de 1 ml; 15 jours après la dernière inoculation, le Lapin est sacrifié, le sang est recueilli stérilement et le

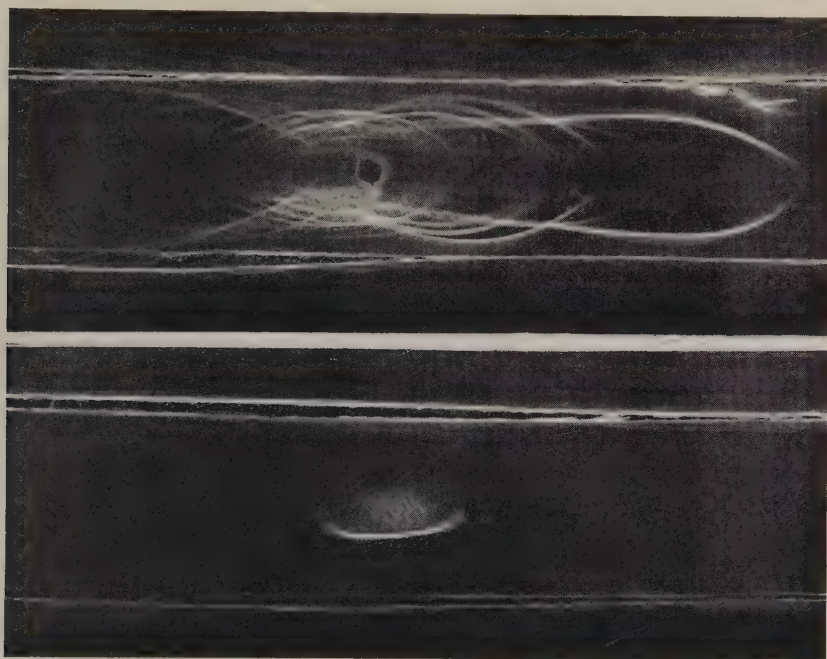


FIG. 7. — Immunoélectrophorèse du sérum humain normal, dans la fente du bas le sérum de Cheval anti-humain normal, dans celle du haut le sérum épuisé par la β -LP.

Le cliché supérieur est coloré au noir amide ;
Le cliché inférieur est coloré au noir Soudan.

sérum est mis en ampoules de 1 ml et conservé en chambre froide à 0°.

La méthode d'Ouchterlony ⁽⁵⁹⁾ appliquée à cet immunsérum avec la solution de β -LP ayant servi pour l'inoculation du Lapin montre une ligne de précipitation unique, ligne rejoignant celle obtenue entre la même solution de β -LP et le sérum anti-humain total (fig. 8).

Le sérum de Lapin anti- β -LP donne également une seule ligne de précipitation avec le sérum humain normal, soit par la méthode d'Ouchter-

Les immunoélectrophorèses ont été effectuées par M^{me} G. Lévy dans notre Laboratoire; qu'elle veuille trouver ici l'expression de notre reconnaissance.

lony, soit par immunoélectrophorèse dans laquelle le sérum de Lapin est introduit dans la fente (fig. 9).

Cette expérience montre la pureté immunologique de la β -LP ainsi préparée. Elle nous fournit d'autre part un sérum immun spécifique.

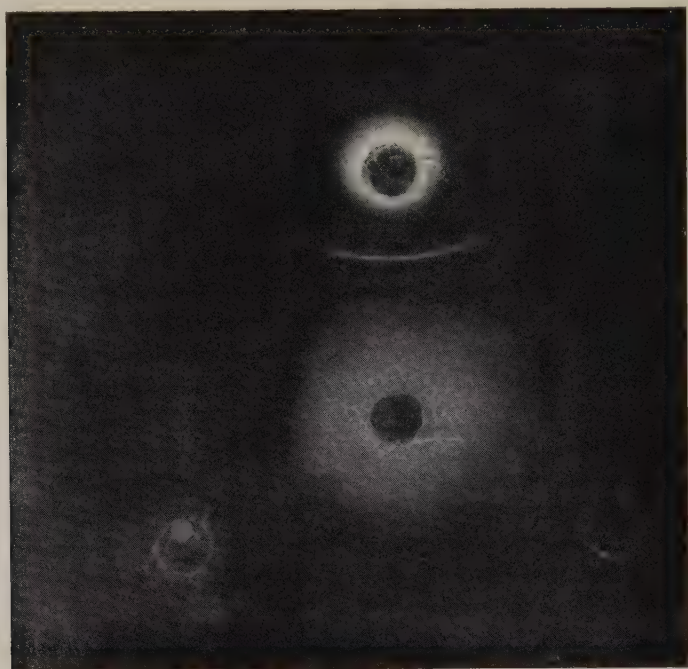


FIG. 8. — Au centre : l'immunsérum de Lapin anti- β -LP ; en haut : β -LP. ; à droite : γ globuline γ à gauche : sérum-albumine.

ULTRACENTRIFUGATION ANALYTIQUE

L'ultracentrifugation analytique montre un constituant unique dont le degré d'homogénéité est difficile à préciser (fig. 10) et dont nous avons déterminé la densité et la vitesse de flottation à dilution infinie.

a) Détermination de la densité de la β -LP.

Cette étude fut réalisée à l'aide d'une ultracentrifugeuse, modèle Spinco, dont le rotor tourne à la vitesse de 59.780 t/mn, un dispositif optique permet de photographier la cellule de centrifugation à des temps déterminés pendant toute la durée de l'expérience.

La fraction étant soumise à l'ultracentrifugation dans un milieu de densité 1,019, nous calculons la vitesse de sédimentation par la formule de Svedberg ⁽⁷⁴⁾. ($1\text{ S} = 10^{-13}\text{ cm/sec/dyne/g}$)

$$\begin{bmatrix} S & \omega^2 t \\ 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} t \\ 0 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1_n & x \\ 0 & x_0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x_t \\ x_0 \end{bmatrix}$$

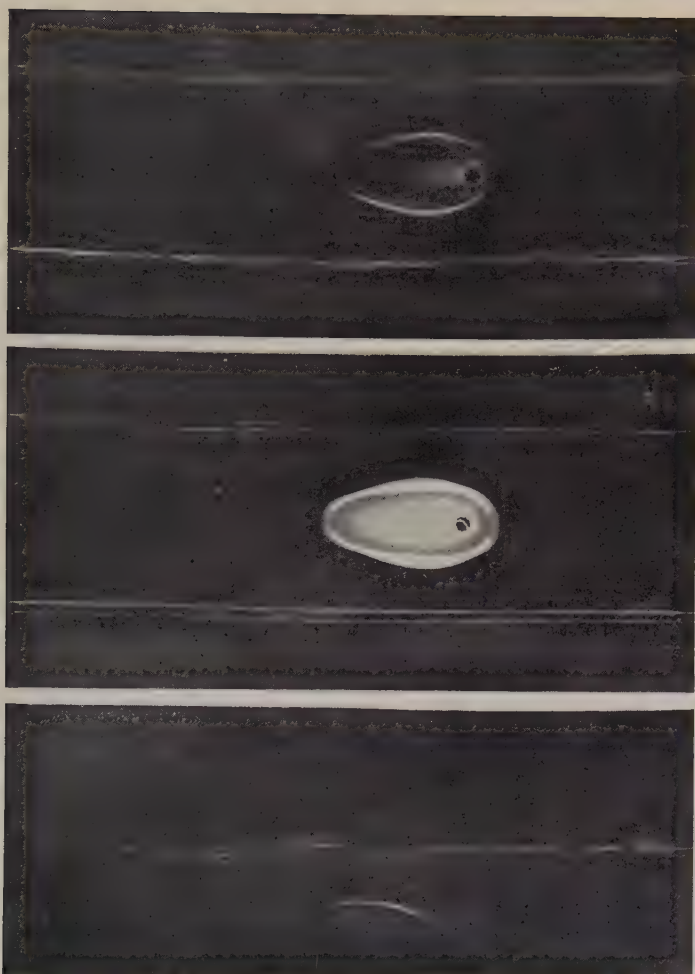


FIG. 9. — Les deux clichés du haut représentent une immunoélectrophorèse de la β -LP l'un coloré au noir amide, le second au noir Soudan. Dans la fente supérieure : sérum de Lapin anti- β -LP ; dans la fente inférieure sérum de Cheval anti-sérum-humain normal.

Le cliché inférieur représente l'immunoélectrophorèse du sérum humain normal contre le sérum de Lapin anti- β -LP dans la fente. Coloration au noir Soudan.

Ou par la relation approchée :

$$S = \frac{2(x_2 - x_1)}{x_2 + x_1} \cdot \frac{1}{\omega^2(t_2 - t_1)}$$

ω étant donné par la valeur $2\pi N$.

N étant le nombre de tours par secondes.

x étant la distance de la frontière à l'axe de rotation au temps t .

Nous calculons la vitesse de flottation de cette fraction en la soumettant à l'ultracentrifugation dans un milieu de densité 1,063. Un simple graphique nous permet alors de déterminer la densité de la fraction si l'on admet que la constante de sédimentation varie linéairement avec la densité, c'est-à-dire que la viscosité varie peu avec la concentration en

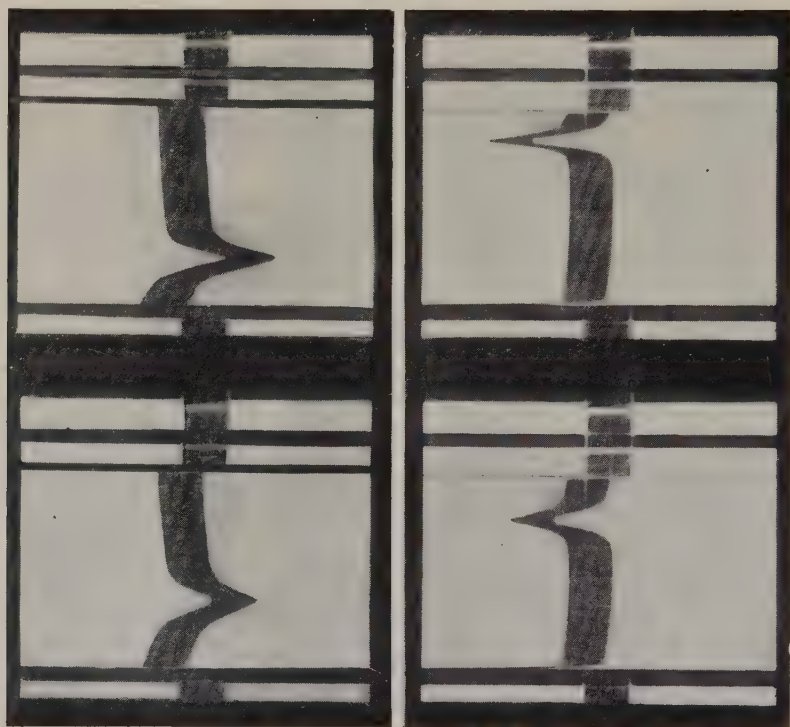


FIG. 10. — Cliché de droite : diagramme de sédimentation de la β -LP densité du milieu 1,019 ; 8 à 16 minutes de centrifugation à 59780 t/mn.

Cliché de gauche : diagramme de flottation de la β -LP densité du milieu 1,063 ; 8 à 16 minutes de centrifugation à 59780 t/mn. La force centrifuge est dirigée vers le bas.

sels et que la constante de diffusion D est pratiquement indépendante de la densité du milieu

$$S = \frac{M D}{R T} \left(1 - \frac{d_{\text{solvant}}}{d_{\text{lipoprotéine}}} \right)$$

Les ultracentrifugations analytiques ont été faites pour partie à la Station centrale du C.N.R.S. et pour partie au Laboratoire des Virus de l'Institut Pasteur par M. P. Slizewicz. Nous les prions de recevoir ici nos vifs remerciements.

On porte en abscisse les densités et en ordonnée les constantes de sédimentation (fig. 11).

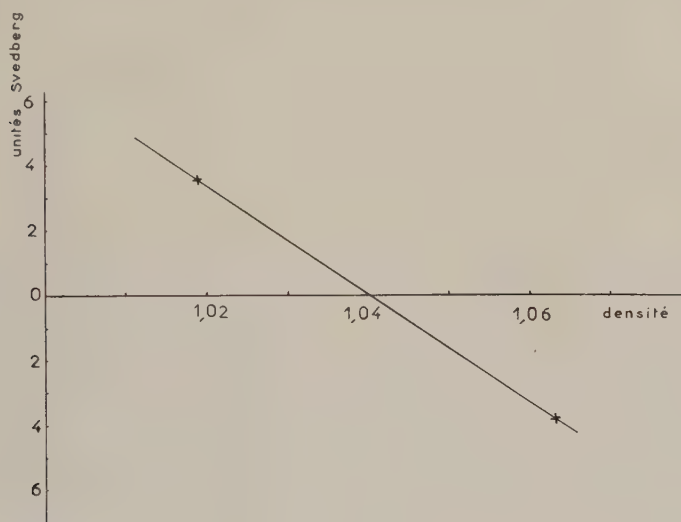


FIG. 11. — Constante de Svedberg en fonction de la densité du milieu. Détermination de la densité de la β -LP.

Le tableau suivant donne les valeurs des constantes pour trois échantillons de β -lipoprotéines isolées de trois sérums.

PRÉPARATION	CONCENTRATION EN mg/ml	S_w à 1,019	S_w à 1,063	DENSITÉ
1	17,5	3,7	— 4,85	1,038
2	13,5	2,95	— 4,7	1,036
3	16,8	3,6	— 3,8	1,040

b) Détermination de la vitesse de flottation à dilution infinie.

La constante spécifique de Svedberg a été calculée pour une dilution infinie en extrapolant la droite donnant les valeurs de la constante de flottation en fonction de plusieurs concentrations (fig. 12) dans un milieu de densité 1,063 à la température de 20°.

PRÉPARATION	CONCENTRATION EN mg/ml	VALEUR DE S_f	VALEUR DE S_f°
4	14,5	4,1	4,9
	10,9	4,3	
	7,25	4,5	

La constante de flottation varie avec la concentration suivant la formule :

$$S_f = S_f^0 (1 - kc)$$

k détermine l'amplitude de l'effet retard dû à la lipoprotéine. Pour notre β -LP, le calcul de la constante nous a donné : 11,25 ml/g.

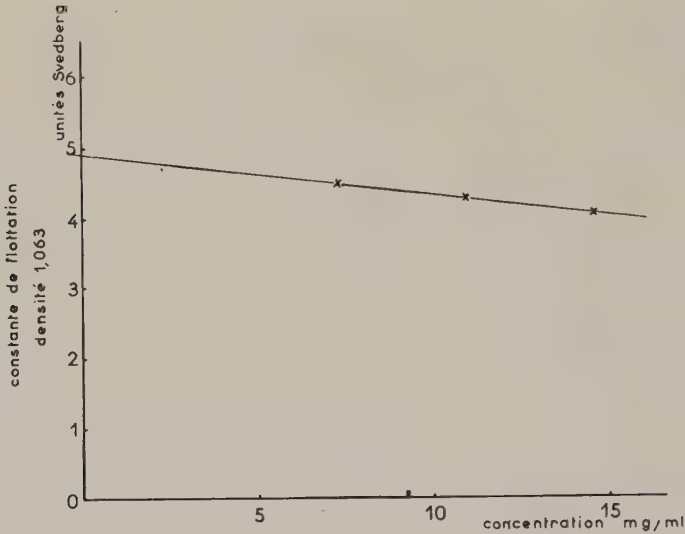


FIG. 12. — Variation de la constante de flottation en fonction de la concentration de la β -LP dans une solution saline de densité 1,063 et détermination de la constante à dilution infinie.

COMPOSITION CHIMIQUE

1° Etude des protéines et des glucides.

Les protéines des lipoprotéines ont été délipidées soit par la méthode à l'alcool-éther, soit par la méthode de Delsal au méthylal-méthanol (¹²). Ces deux techniques permettent une extraction totale des lipides. Après dessiccation sous vide à la température du laboratoire, en présence d'anhydride phosphorique, le poids total des protéines est déterminé par pesée et le dosage d'azote effectué sur chaque échantillon par la microméthode de Dumas.

Protéines en mg p. 100 mg de LP	18	25	19	21	22	19	20
Azote en mg p. 100 mg de protéine	14	14	13	14	13,5	14	14
Sucre en mg p. 100 mg de protéine	2,5	1,9	1	2,2	1,7	2,4	2,4

La présence de glucides mise en évidence par électrophorèse fut confirmée par le dosage dans les protéines séchées. Cette détermination a été faite par la méthode à l'orcinol sulfurique ⁽⁷³⁾ par rapport à une courbe étalon galactose-mannose (1/1).

Des hydrolyses chlorhydriques de la protéine délipidée (20 mg 2 ml ClH N) pendant 40 mn, 90 mn et 3 heures à 100° n'ont révélé que deux taches nettement visibles après chromatographie de partage (20 à 25 heures) dans le solvant n-propanol-acétate d'éthyle-eau (7-1-2) ⁽¹⁾ et coloration à l'oxalate d'aniline ⁽³⁴⁾. Ces deux taches ont un R_f identique aux témoins *galactose* et *mannose* dans le solvant déjà cité de même que

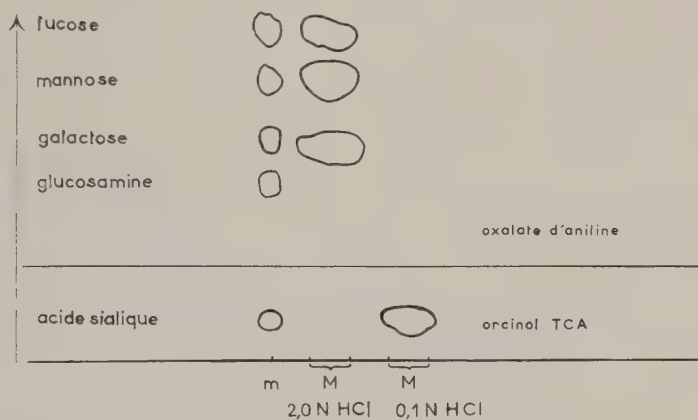


Fig. 13. — Chromatographie de partage à écoulement. Solvant : butanol-pyridine-0,1 N HCl (5-3-2). Durée 20 h., température 25°, papier Schleicher et Schüll 2043 b.

M = hydrolysats de 20 mg. de protéines ; m = mélange témoin.

dans les deux autres solvants : butanol-acide acétique-eau (4-1-5) 44 à 48 heures ⁽⁶⁰⁾ et acétate d'éthyle-pyridine-eau (2-1-2) 18 heures ⁽²¹⁾.

Nous avons mis en évidence la présence d'un composé qui se comporte en chromatographie comme un acide sialique. Pour cela, nous avons effectué une hydrolyse chlorhydrique ménagée de 1 heure à 100° (20 mg/20 ml de ClH 0,1 N) puis, après filtration, nous avons repris le résidu par 20 ml de ClH 2 N chauffé de nouveau 1 heure à 100°.

Après chromatographie dans le solvant butanol-pyridine-ClH 0,1 N (5-3-2) ⁽⁷⁾ sur papier Schleicher et Schüll 2.043 b, une première révélation par l'orcinol-trichloracétique ⁽³⁶⁾ montre une tache identique à celle de l'acide acétyl-neuraminique après hydrolyse par ClH 0,1 N (fig. 13), une deuxième révélation par l'oxalate d'aniline montre après hydrolyse par ClH 2 N deux taches jaunes correspondant au galactose et au mannose et une tache rose dont le R_f est celui du fucose. Les deux composés *acide sialique* et *fucose* sont donc présents, mais en quantité très faible, la majeure partie des sucres de notre protéine étant le galactose et le mannose.

Il n'a pas été possible de mettre en évidence dans les conditions d'hydrolyses précédentes la présence d'osamine.

2° Etude des lipides.

Nous avons déjà montré ⁽⁶⁴⁾, ainsi que d'autres auteurs ^(23 - 32), que toutes les catégories de lipoprotéines plasmatiques renferment qualitativement les mêmes constituants lipidiques : glycérides, stérides, stérols et phosphoaminolipides.

Les lipides totaux (L.T.) de la β -LP extraits par la méthode de Delsal et repris par le chloroforme ont été séchés et pesés ; le taux des lipides est très élevé et varie de 78 à 81 p. 100.

Le cholestérol total (C.T.) ⁽⁴²⁾ a été dosé par la méthode de Liebermann (anhydride acétique et acide sulfurique).

Les acides gras estérifiés (A.G.E.) ont été dosés par une méthode personnelle ⁽³⁵⁾, d'après celle de Bauer et Hirsch ⁽²⁾.

Les phosphoaminolipides ont été calculés en multipliant par 25 le taux du phosphore dosé par la méthode de Machebœuf et Delsal ⁽⁴³⁾. Nous désignerons le phosphore lipidique par Pl. et les phosphoaminolipides par Pal. au cours de ce travail.

L'azote a été mesuré par la méthode de Kjeldahl.

Les dosages de choline ont été effectués par la méthode de Ducet et Kahane ⁽¹⁶⁾.

Le tableau suivant résume la composition de huit préparations différentes de β -LP.

L.T. mg p. 100 mg de β -LP	C.T. mg p. 100 mg de β -LP	Pal. mg p. 100 mg de β -LP	A.G.E. ueq. p. 100 mg de β -LP	Pl. ueq. p. 100 mg de β -LP	Azote ueq. p. 100 mg de β -LP	Choline ueq. p. 100 mg de β -LP
78	27,4	14,5	82	18,7	39	—
81	28	16,5	94,5	21,3	49,5	—
79	26	13	89	16,8	30	—
81	26,5	14,8	102	19,2	43,5	—
81	27,5	16,8	84	21,8	—	—
80	27	16	73	20,6	—	19,7
84	34	19	100	25	—	23
80	30	16	98	20,5	—	19

Ces résultats nous donnent un rapport cholestérol/phospholipides=1,8 ou en équivalents molaires cholestérol/phosphore=3,6. Ce rapport est légèrement variable avec le sérum étudié. Le rapport phosphore/choline est de 1,1, montrant une prédominance de phospholipides choliniques.

Le taux d'azote, qui est près du double de celui de la choline, peut être attribué aux peptides et à d'autres constituants azotés qui accompagnent les lipides, car il ne peut s'expliquer par la petite quantité de sphingosine présente. Il est intéressant de noter que ces peptides sont liés dans le sérum aux lipides des lipoprotéines puisqu'ils ne sont pas séparés par ultracentrifugation.

Nous n'avons pas trouvé d'acide sialique ni d'osés. La sensibilité des méthodes employées nous permet d'affirmer qu'il y en a moins de 1 p. 100.

3° Séparation des divers composés lipidiques.

a) Séparation par couple de solvants.

En nous appuyant sur les travaux de L. Douste-Blazy et J. Polonovski ⁽¹³⁾, nous avons essayé de séparer les lipides par partage entre deux phases organiques. Après plusieurs essais de couples de solvants, nous avons choisi celui qui permet le fractionnement le plus intéressant dont la composition en volume est la suivante :

Eau : 1 ; méthanol : 10 ; acide acétique : 10 ; chloroforme : 4 ; éther de pétrole : 22.

Le mélange se sépare en deux couches : la phase supérieure contient l'éther de pétrole, la phase inférieure renferme le méthanol. Les lipides neutres passent dans la phase éthérée avec une petite fraction phosphorée tandis que la phase alcoolique retient la majeure partie des phospholipides entraînant un peu de cholestérol.

	L.T. mg	C.T. mg	Pal. mg	A.G.E. µeq	Pl. µeq
Extrait total	100	35	21	116	27
Phase éthérée ...	57	32	3	55	4
Phase alcoolique .	46	3	18	42	23

Ce premier fractionnement nous permet d'estimer les acides gras estérifiés des phospholipides dans la phase alcoolique ; les acides gras de l'autre phase sont liés d'une part au cholestérol, d'autre part au glycérol. La différence des dosages des acides gras estérifiés totaux avant et après séparation est due, pensons-nous, à une hydrolyse partielle des lipides au cours du fractionnement.

Si nous lavons la phase éthérée avec une même quantité de phase alcoolique, nous voyons que 90 p. 100 des phospholipides contenus dans cette phase éthérée passe dans la phase alcoolique, 10 p. 100 restant encore dans la phase éthérée ; un deuxième lavage de cette phase nous permet encore de faire passer 90 p. 100 des phospholipides restants dans la phase alcoolique, la phase supérieure gardant 0,1 p. 100 des phospholipides totaux, quantité très faible et pratiquement indosable. Pour le cholestérol restant dans la phase alcoolique, nous obtenons à peu près les mêmes résultats en lavant cette phase deux fois avec la phase supérieure.

L. Douste-Blazy ⁽¹⁴⁾ a montré sur les lipides plasmatiques totaux qu'après 30 lavages de la phase inférieure avec la phase éthérée, il restait une fraction phospholipidique hydrosoluble constituée essentiellement de lysolécithine. Nous avons donc appliqué la méthode du contre-courant ⁽⁶³⁾ en effectuant 30 lavages de notre phase alcoolo-acétique par une même quantité de phase éthérée ; les résultats suivants furent obtenus.

	L.T. mg	C.T. mg	Pal. mg	A.G.E. µeq	Pl. µeq	A.G.E./ Pl.
Phase éthérée .	59	30	3	54	3,5	—
1 ^{er} lavage	7	2,7	1,3	6	1,7	—
2 ^e lavage	3,6	0,9	1,6	3,3	2	1,6
3 ^e -14 ^e lavages . .	15	0,3	7,4	16,5	10	1,6
15 ^e -29 ^e lavages .	6	—	2,7	5,5	3,5	1,5
Phase alcoolique	17	—	3,9	6	5	1,2

Les phases éthérées successives entraînent la majeure partie des phospholipides. Le rapport A.G.E./Pl. y est régulièrement inférieur à 2, il s'agit donc d'un mélange non séparé de lécithine et d'une fraction phospholipidique de rapport inférieur (sphingomyéline). Enfin la phase alcoolique restante contient 15 à 20 p. 100 des phospholipides, très peu solubles dans la phase éthérée ayant un rapport A.G.E./Pl. proche de 1.

Il semble donc que nous soyons ici en présence de plusieurs phospholipides qu'il est assez difficile de séparer de façon nette par cette méthode. Une confirmation de ces différences nous a été donnée par chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique suivant la technique de Marinetti ⁽⁵³⁾ après révélation par la rhodamine B. L'extrait lipidique total donne 3 taches phospholipidiques très distinctes dont la troisième a un R_f de lysolécithines. La phase alcoolique restante donne bien la tache inférieure correspondant sans doute à la lysolécithine, dans les 2 premiers lavages nous trouvons les deux taches supérieures mais dans les autres lavages réunis (3^e - 14^e) et (15^e - 29^e) on voit les 3 taches prouvant que la lysolécithine est partiellement extraite.

b) Séparation par chromatographie sur colonne.

La chromatographie sur colonne d'acide silicique préconisée par Fille-
rup et Mead ⁽²⁰⁾ et par Marinetti et Stotz ⁽⁵²⁾ nous a permis d'analyser les lipides avec plus de précision.

Par dissolution simple dans l'acétone de l'extrait lipidique total laissé en contact 12 à 15 heures en chambre froide à — 10° nous séparons les lipides en deux fractions. La phase acétonosoluble contient le cholestérol et les glycérides, le dépôt acétoninsoluble comprend les phospholipides.

A. Phase acétonosoluble.

Les lipides neutres ont été chromatographiés sur acide silicique après pesée et redissolution dans l'éther de pétrole (Eb. 70°-80°). Ils sont séparés en cinq fractions.

Ether de pétrole contenant	1 p. 100	d'éther	:	cholestérol estérifié.
Ether de pétrole	»	4 p. 100	»	: triglycérides.
Ether de pétrole	»	10 p. 100	»	: cholestérol libre.
Ether de pétrole	»	50 p. 100	»	: acides gras libres et esters indéterminés.
Méthanol pur			:	substances indéterminées.

Le tableau suivant montre les résultats obtenus.

	FRACTION 1	FRACTION 2	FRACTION 3	FRACTION 4	FRACTION 5
L.T. mg	14	2	5	2	1
C.T. mg	9	0	4	0,7	0
A.G.E. μ eq.	13	6	3	2	—

Nous avons vérifié que la première fraction était bien constituée d'ester de cholestéryle en effectuant une chromatographie sur papier imprégné d'acide silicique utilisant comme éluant le mélange heptane-diisobutylcétone (96-6) suivant Marinetti ⁽⁵¹⁾ et nous n'avons obtenu qu'une seule tache de R_f 0,95. La deuxième fraction donne une seule tache de R_f 0,90 correspondant à des triglycérides. La troisième fraction contient le cholestérol libre, cette fraction par chromatographie sur papier donne une tache unique de R_f 0,40 identique à celle du cholestérol témoin. La quatrième fraction contient les acides gras libres qui donnent par chromatographie sur papier une tache bleutée très faible apparaissant au-dessus de la tache de cholestérol libre (visible dans cette fraction) et une trainée à partir du dépôt, sur 2 à 3 cm, de lipides indéterminés. La cinquième fraction contient encore des traces de substances indéterminées.

B. Phase acétonoin soluble.

Les lipides acétonoin solubles ont été fractionnés après émulsion dans le chloroforme par passage sur une colonne d'acide silicique ⁽⁵⁰⁾ à l'aide des solvants suivants :

	p. 100 du Pl. total
Chloroforme-méthanol (80-20)	10
Chloroforme-méthanol (50-50)	78
Méthanol pur	10
Acide acétique.	

Les phospholipides sont répartis en plusieurs familles.

Une première non colorable par le réactif de Dragendorff ⁽⁸⁾ contient environ 10 p. 100 du phosphore et passe dans le solvant chloroforme-méthanol (4-1). Cette fraction correspond habituellement dans les extraits tissulaires à des céphalines, cependant dans la β -LP il s'agit sans doute d'autres phospholipides non identifiés car il n'est pas possible de révéler ni colamine ni sérine en quantité suffisante et le rapport acides gras/phosphore est trop élevé. Cette fraction présente plusieurs taches en chromatographie sur papier et nous la désignons provisoirement sous le nom de « pseudo-céphalines ».

Un deuxième groupe de phospholipides est élué par le solvant méthanol-chloroforme 1/1. Il comprend au moins deux phospholipides principaux. Par chromatographie sur papier silicique (solvants : diisobutylcétone - acide acétique - eau 40-25-5) ⁽⁵³⁾, qui révèle deux taches de R_f 0,44 et 0,36 colorables par la rhodamine B et le réactif de Dragendorff, nous avons pu montrer que le premier lipide cholinique était plus concentré au début de l'éluion de la colonne ; il représente une lécithine, le rapport acide gras/phosphore étant de 2. L'autre tache de R_f 0,36 correspond à la

position d'une sphingomyéline cérébrale. Or la fraction mise en évidence dans notre β -LP est le phospholipide le plus abondant (50 p. 100), il est exclu qu'il s'agisse seulement d'une sphingomyéline (malgré la présence démontrée de sphingosine) (1), car le dosage d'acides gras estérifiés donne un chiffre trop élevé. Il est possible que cette fraction soit encore un mélange d'une sphingomyéline et d'un autre lipide cholinique non identifié.

La dernière fraction, soluble dans le méthanol, de rapport acides gras/phosphore peu différent de 1, donne en chromatographie sur papier une tache de R_f 0,32 correspondant à celui d'une lysolécithine.

En résumé, la composition de la β -LP s'établit de la manière suivante :

Protéines 20 p. 100 (comprenant 0,4 p. 100 de glucides).

Lipides totaux 80 p. 100.

Cholestérol total ...	27 à 30 p. 100	
Cholestérol libre	8	à 10 p. 100
Cholestérol estérifié	20	à 22 p. 100
Triglycérides	7 à 12 p. 100	
Phospholipides	18 à 20 p. 100	
Pseudocéphalines	1,8	à 2 p. 100
Lécithine	5	à 6 p. 100
Sphingomyéline et autres lipides choliniques	9	à 10 p. 100
Lysolécithine	2	p. 100

STABILITE DE LA β -LIPOPROTEINE ISOLEE

La β -lipoprotéine isolée par ultracentrifugation est obtenue en solution saline de faible densité ; mise en glacière en flacon bouché, elle se trouble assez rapidement et irréversiblement ; nous avons essayé de déterminer les causes de cette instabilité et les moyens d'y remédier :

- 1° Etude de la mobilité électrophorétique au cours du vieillissement ;
- 2° Influence de la dialyse sur la fraction ;
- 3° Influence de la température.

1° Etude de la mobilité électrophorétique au cours du vieillissement.

Une solution de β -lipoprotéine mise en glacière à 4° C environ se conserve intacte 5 à 6-jours ; nous avons suivi son comportement ultérieur par électrophorèse sur papier.

Si la solution est diluée (environ 12 mg/ml), au bout de 8 jours nous

(1) La sphingosine a été décelée par chromatographie sur papier avec le solvant de Partridge après hydrolyse chlorhydrique prolongée et extraction dans l'éther de pétrole en milieu basique.

notons une augmentation de sa mobilité apparente avec une trainée tout le long du papier, colorable comme lipide et comme protide ; au bout de 15 jours, une dénaturation s'accompagne d'un précipité au fond du tube et d'un dépôt sur la ligne de départ de l'électrophorèse.

Si la solution est concentrée (20 à 25 mg/ml), sa conservation est meilleure et, au bout de 8 jours, l'électrophorèse ne décèle aucune modification de la bande lipoprotéinique ; au bout de 3 semaines, la mobilité est un peu plus grande et une légère trainée apparaît sur le papier.

Certains auteurs ont pensé que cette dénaturation était due à une oxydation des molécules ; nous pouvons confirmer cette opinion car, lorsque nous conservons cette fraction en atmosphère d'azote, nous voyons au bout de 3 semaines sa mobilité électrophorétique inchangée, alors que la même fraction conservée à l'air migre plus rapidement.

Il semble donc possible en plaçant une fraction concentrée en atmosphère d'azote de la conserver un certain temps, sans dénaturation possible.

2° Influence de la dialyse.

Notre β -LP se trouve isolée en solution de bromure de potassium ($d=1,019$).

Nous avons essayé de la purifier par dialyse à 4° C contre une solution

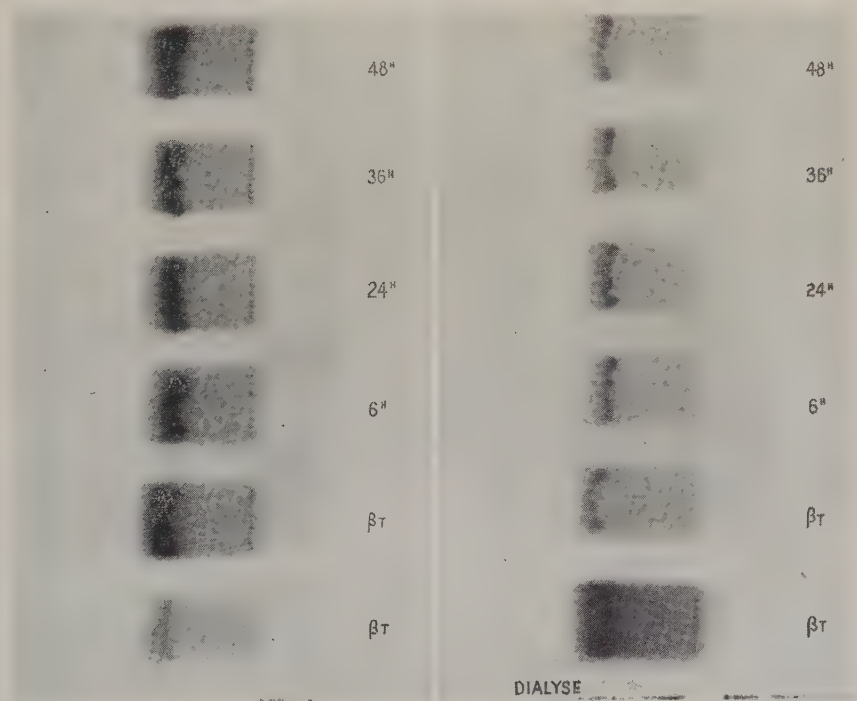


FIG. 14. — Cliché de gauche : coloration au noir Soudan avec témoin coloré au bleu de bromophénol ; cliché de droite : coloration au bleu de bromophénol avec témoin coloré au noir Soudan.

de chlorure de sodium physiologique (0,9 p. 100) afin d'éliminer le bromure de potassium et les autres substances dialysables qui l'accompagnent lors de son isolement (acides aminés, etc.).

La β -LP se dénature alors assez rapidement : il apparaît un précipité dans le sac à dialyse, la mobilité électrophorétique augmente avec une trainée tout le long du papier.

Nous avons imaginé une technique de dialyse non dénaturante en protégeant de l'oxydation la lipoprotéine par un compartiment intermédiaire contenant des protéines déjà dialysées. Le sac de cellophane contenant la β -LP est enfermé dans un autre sac de cellophane contenant du sérum, dialysé lui-même contre la solution saline extérieure.

Nous avons suivi par électrophorèse l'aspect de cette fraction au cours du temps pendant lequel est effectuée cette dialyse. Nous avons pu pousser la dialyse jusqu'à 48 heures (fig. 14) sans aucune dénaturation apparente. La β -LP subit une légère concentration, nous avons vérifié d'autre part la stabilité des acides gras estérifiés ; le tableau suivant montre les résultats.

TEMPS DE DIALYSE	Pr. T. mg	L.T. mg	C.T. mg	Pl. μ g	A.G.E. μ eq
6 heures	5,1	16,2	5,8	133	17,5
24 heures	5,4	17,4	5,9	140	18,3
36 heures	5,5	17,6	5,9	142	18,5
48 heures	5,6	18,3	6,2	153	19,2

Toutes ces expériences montrent que la fraction β -lipoprotéique est fragile ; mais, dans des conditions bien déterminées, elle peut être purifiée et conservée quelques jours. En solution concentrée, la β -LP est moins sensible à l'oxydation.

3° Influence de la température.

Sachant ce que devenait notre fraction au cours du temps, soit à température ambiante (20 à 23°), soit à la température de 4 à 6° C, nous avons étudié l'effet d'une incubation à 37° C. et nous avons suivi sa migration électrophorétique à différents intervalles de temps.

Pour une lipoprotéine diluée, dès 15 heures d'incubation, la mobilité électrophorétique augmente. Cette augmentation s'accroît jusqu'à 48 heures d'incubation, la fraction traîne alors sur le papier avec un dépôt sur la ligne de départ (fig. 15).

Pour une lipoprotéine concentrée, l'augmentation de la mobilité électrophorétique commence aussi vers 15 heures, mais plus faiblement que dans le cas précédent (fig. 15).

Après différentes durées d'incubation de cette fraction, nous avons extrait et dosé les lipides. Notre première expérience, faite sur une β -lipoprotéine de concentration 10 mg/ml, nous a montré une diminution du phosphore lipidique d'environ 14 p. 100 au bout de 15 heures, atteignant 40 p. 100 au bout de 24 heures, avec une très faible diminution du taux des acides gras estérifiés : 10 p. 100 pour 24 heures. Dans

une seconde expérience avec une lipoprotéine de concentration 19 mg/ml, nous avons également observé une diminution des phospholipides, que nous avons précisée en les séparant par couple de solvants. L'augmentation des acides gras estérifiés dans la phase étherée est significative et

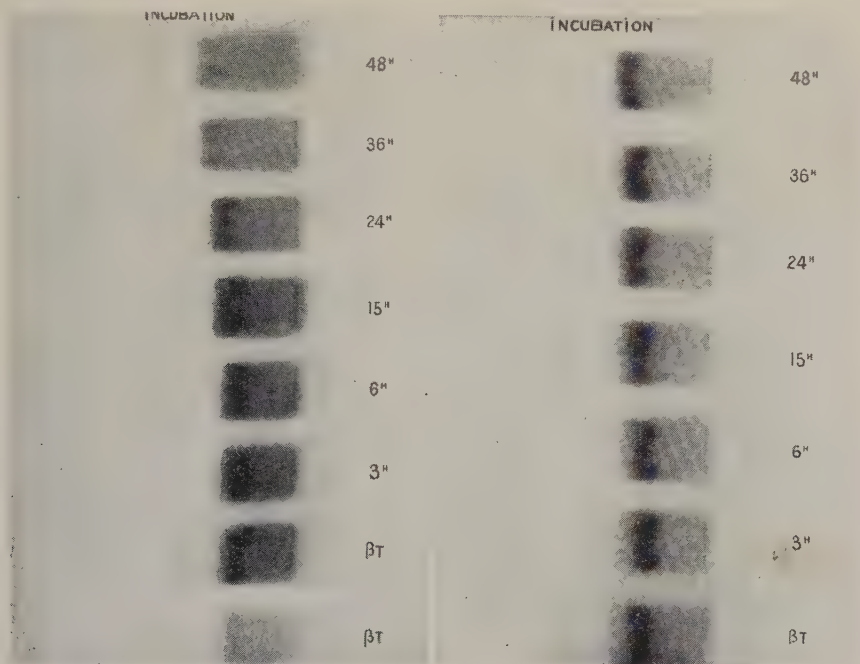


FIG. 15. — Coloration au noir Soudan. Cliché de droite : β -LP concentrée ; cliché de gauche : β -LP diluée.

correspond à ce que l'on observe dans l'incubation du sérum total ⁽¹⁹⁾ : hydrolyse des phospholipides couplée à l'estérification du cholestérol.

Ces résultats nous montrent qu'à 37° C les β -LP subissent des remaniements plus profonds qu'à 0° : les phospholipides s'hydrolysent et le cholestérol s'estérifie. Il faut donc admettre que le processus est indépendant de la présence d'autres protéines sériques, soit que les enzymes en cause se trouvent associés à la β -LP, soit qu'il s'agisse d'un phénomène non enzymatique.

ASSOCIATIONS MOLECULAIRES ENTRE SAVON ET LIPOPROTEINE

L'obtention d'une lipoprotéine purifiée nous a permis d'étudier l'action des détergents sur cette fraction.

1° Etude de la mobilité électrophorétique de la lipoprotéine en présence de savon :

- a) sur papier;
- b) en veine liquide.

2° Etude de la vitesse de sédimentation de la lipoprotéine en présence de savon et détermination de la densité des associations lipoprotéine-savon.

3° Etude de la lumière diffusée par la lipoprotéine en présence de savon.

4° Extractibilité des lipides dans l'éther en présence de détergents.

Pour ces expériences, nous avons utilisé :

I. L'oléate de sodium (Merck) dissous dans l'eau bi-distillée débarrassée de CO_2 par ébullition. Nous avons préparé chaque fois extemporanément une solution d'oléate à 10 p. 100.

II. Le cholate de sodium R.P. préparé dans les mêmes conditions.

III. Le zéphirol (chlorure d'alkylbenzyltriméthylammonium) à prédominance de chaînes en C_{12} (laboratoire Clévenot) dont la solution à 10 p. 100 est très stable.

L'addition de savon à la solution de β -LP est toujours effectuée en agitant doucement afin d'éviter le moussage et d'autre part une sur-concentration locale très élevée.

1° ACTION DES DETERGENTS SUR LA MOBILITE ELECTROPHORETIQUE

α) Electrophorèse sur papier.

La mobilité électrophorétique des lipoprotéines change sous l'influence des substances tensioactives ioniques. Nous avons coloré les protéines et les lipides de la β -LP soumise à l'action des détergents anioniques (oléate de Na et cholate de Na) et du zéphirol, détergent cationique.

Les expériences ont été faites par électrophorèse sur papier dans l'appareil Lérès et suivant les techniques de coloration décrites précédemment; le mélange de détergent à la fraction lipoprotéique a été effectué immédiatement avant le dépôt sur papier, mais on obtient les mêmes résultats si le mélange est préparé quelques heures à l'avance.

Les solutions de β -LP utilisées contenaient 18 mg de lipides et 4 mg de protéines par ml.

Oléate de sodium.

Les concentrations d'oléate utilisées s'échelonnent de 0,1 mg à 2 mg/ml. Les protéinogrammes et les lipidogrammes (fig. 16) montrent une mobilité accrue dès la concentration de 0,1 mg/ml et ce déplacement augmente avec la concentration en oléate. A partir de 1 mg/ml,

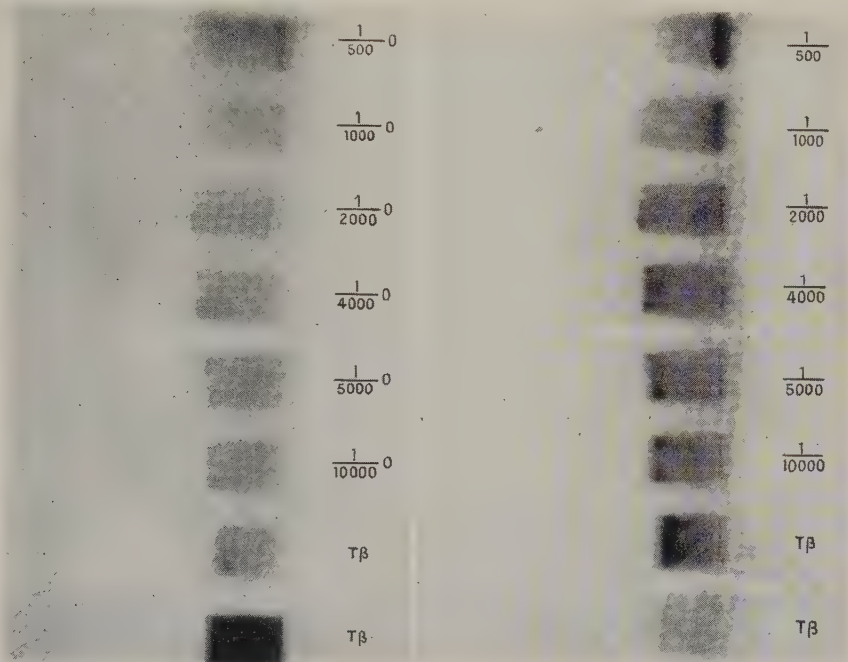


FIG. 16. — Electrophorèse de la β -LP en présence de quantités croissantes d'oléate de sodium.

Cliché de droite, coloration au bleu de bromophénol avec témoin coloré au noir Soudan ; cliché de gauche, coloration au noir Soudan avec témoin coloré au bleu de bromophénol.

une fraction lipoprotéinique reste sur la ligne de départ montrant une dénaturation partielle de la cénapse.

La mobilité apparente de la β -LP peut être estimée à partir d'une « ligne neutre » (électrophorèse de dextrane). Si nous prenons la mobilité de la β -LP comme unité μ_0 , la mobilité des associations oléate-lipoprotéine peut être calculée ainsi que le rapport μ/μ_0 pour les associations n'ayant pas subi de dénaturation.

	0,1 mg/ml	0,2 mg/ml	0,25 mg/ml	0,5 mg/ml
μ/μ_0	1,07	1,10	1,15	1,24

Cholate de sodium.

Quoique également anioniques les sels biliaires accélèrent peu la cénapse et cette action se fait sentir pour des concentrations deux fois

plus élevées. Une dénaturation partielle manifestée par un dépôt sur la ligne de départ apparaît pour 10 mg/ml de cholate (fig. 17).

Aucune dissociation n'est visible entre les lipides et les protéines de la fraction. Le détergent ne détache pas les lipides mais s'associe à la molécule. La quantité de détergent amenant une dénaturation de la β -LP isolée est beaucoup plus faible qu'au sein du sérum (Mora, Polonovski, Rebeyrotte) ⁽³⁵⁾. Il semble bien que les β -lipoprotéines soient protégées par les autres protéines du sérum.

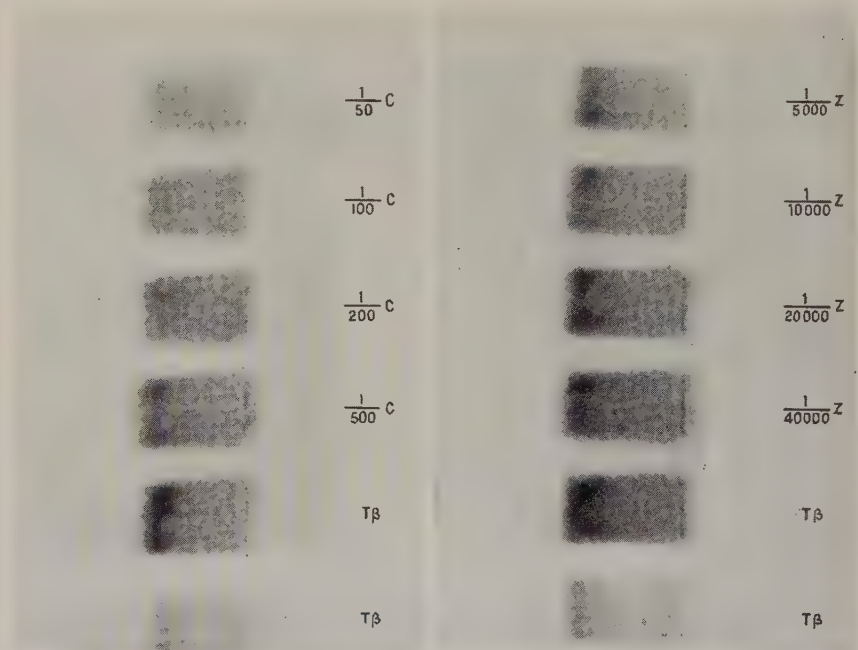


FIG. 17. — Electrophorèse de la β -LP. Cliché de droite : en présence de zéphirol.
Cliché de gauche : en présence de cholate de sodium.
Coloration au noir Soudan avec témoin coloré au bleu de bromophénol.

Zéphirol.

Ce détergent cationique précipite la β -LP pour une concentration très faible (à partir de 0,3 mg/ml) ; nous ne retrouvons pratiquement pas l'action retardatrice qu'on observe dans le sérum (fig. 17) et qui se manifesterait pour une concentration de 0,1 mg/ml ou de 0,2 mg/ml de β -lipoprotéine. Nous n'avons pas trouvé d'explication à cette différence de comportement.

D'une manière générale, les résultats sont en accord avec l'étude des détergents sur les protéines du plasma, où la sérumalbumine serait la première à fixer des anions gras ⁽²⁶⁾. Cette fixation modifie peu la mobilité électrophorétique de cette albumine tandis que les associations lipoprotéines-anions gras subissent ioniquement une altération plus importante.

Les détergents cationiques, au contraire, se fixent d'abord sur les cénapses lipoprotéiniques. Les cations gras ne se fixent qu'ensuite sur la presque totalité des protéines ⁽⁶²⁾.

b) Electrophorèse en veine liquide.

Il est très difficile d'estimer la mobilité absolue des lipoprotéines sur papier en raison du freinage ⁽⁴⁶⁾, nous avons donc effectué, en appareil de Tiselius, les électrophorèses des associations de β -LP—savon à pH 8,6 (tampon véronal $\Gamma=0,05$). Les mesures ont été faites pour deux concentrations d'oléate de sodium dans les conditions suivantes :

β -LP 20 mg/ml oléate de Na 0,25 mg/ml et 0,50 mg/ml.

Les mobilités moyennes ont été calculées à partir des résultats de deux durées différentes d'électrophorèse pour la branche descendante :

μ_0	β -LP	$-3,7 \cdot 10^{-5}$ cm/sec/v/cm	μ/μ_0
μ_1	β -LP+oléate 0,25	$-5,6 \cdot 10^{-5}$ —	1,5
μ_2	β -LP+oléate 0,50	$-7,5 \cdot 10^{-5}$ —	2,0

L'augmentation de la mobilité avec la concentration d'oléate est nettement plus élevée que sur papier. Ce résultat est sans doute explicable par un plus grand freinage du papier pour l'association oléate-lipoprotéine que pour la lipoprotéine seule.

Si l'on admet (comme nous le verrons plus loin) que tout l'oléate est fixé sur la β -LP, le nombre d'anions gras ajoutés serait de 125 et de 250 par molécule de β -LP de masse molaire 3.000.000.

2° ETUDE DE LA VITESSE DE SEDIMENTATION ET DE LA DENSITE DE LA CENAPSE LIPOPROTEINE-SAVON

L'ensemble lipoprotéine-détergent se comporte comme une nouvelle cénapse au cours de l'électrophorèse. L'ultracentrifugation nous a amené à la même conclusion. Nous avons pu déterminer les constantes de Svedberg et la densité de la nouvelle cénapse.

Deux proportions d'oléate de sodium ont été ajoutées à la lipoprotéine dans les conditions suivantes :

β -LP 16 mg/ml oléate de Na 0,5 mg/ml et 1 mg/ml

Nous obtenons une seule frontière de flottation ou de sédimentation dont la vitesse de déplacement est différente de celle de la lipoprotéine seule. Nous avons déterminé la constante de Svedberg de l'association β -LP—oléate dans une solution de densité 1,063.

Les valeurs de $S_{f\ 1,063}$ et de la constante k , coefficient de l'effet retard dû à la lipoprotéine, sont les suivantes :

	$S_{f\ 1,063}$	k
β -LP	4,9	11,25
β -LP+oléate 0,5 mg/ml	5	9,25

Nous avons déterminé la densité des associations lipoprotéine-savon en mesurant les constantes de flottation dans un milieu de densité 1,063 et de sédimentation dans un milieu de densité 1,019.

	S_{w} à 1,019	S_{w} à 1,063	DENSITÉ
β -LP	3,6	— 3,8	1,040
β -LP+oléate 0,5 mg/ml	3,42	— 5	1,0365
β -LP+oléate 1 mg/ml	2,94	— 5,95	1,0335

La figure 18 montre un décalage des droites correspondant à la diminution de la densité en fonction de la quantité d'oléate ajoutée.

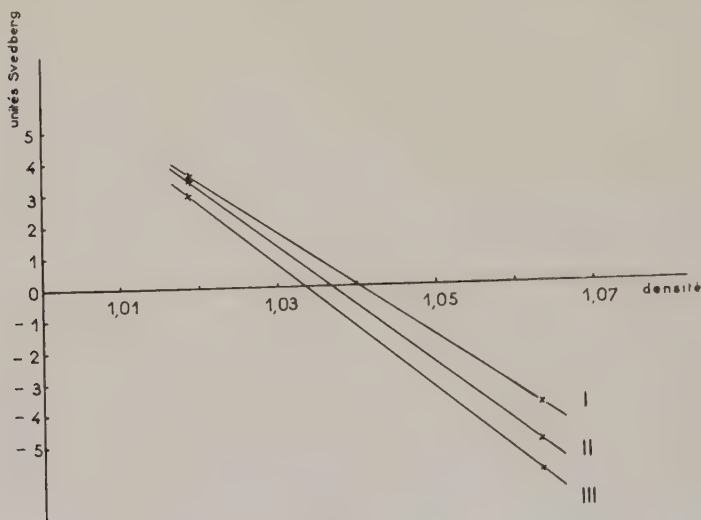


FIG. 18. — Détermination de la densité de la β -LP.

- I. — β -LP seule ;
- II. — β -LP + oléate 2,5 p. 100 ;
- III. — β -LP + oléate 10 p. 100.

3° ETUDE DE LA LUMIERE DIFFUSEE PAR LA LIPOPROTEINE EN PRESENCE DU SAVON.

L'étude de la lumière diffusée par la β -lipoprotéine en solution nous a permis de déterminer la masse molaire moyenne de cette β -lipoprotéine et nous a apporté une confirmation quant à l'existence d'une association lipoprotéine-savon. Les mesures de diffusion ont été effectuées en collaboration avec M^{lle} Guinand (1) au laboratoire du Professeur Wurmser (²⁷⁻²⁹). Toutes les mesures ont été faites à la température de laboratoire (20 à 22°), pour la longueur d'onde $\lambda = 4.358 \text{ \AA}$, en solution de densité 1,019, solution d'isolement de la β -lipoprotéine.

(1) Nous remercions très vivement M^{lle} Guinand pour l'aide et les conseils qu'elle nous a donnés.

α) Détermination de la masse molaire.

La masse molaire M d'un corps en solution s'exprime en fonction de l'intensité diffusée par la relation :

$$\frac{I}{M} = K \frac{c}{I_v} + 2 Bc$$

avec : $K = k \lambda^4 \left(\frac{\Delta n}{\Delta c} \right)^2 \varphi(\rho)$ et $\varphi(\rho) = \frac{3 + 3\rho_v}{3 - 4\rho_v}$

I_v = intensité diffusée par le corps dissous, la lumière incidente étant polarisée verticalement ;

c = concentration en mg/ml ;

B = coefficient qui traduit l'interaction entre les molécules ;

λ = longueur d'onde dans le vide ;

k = facteur qui dépend de l'appareil ;

ρ_v = facteur de dépolarisation ;

n = indice de la solution ;

$\frac{\Delta n}{\Delta c}$ = incrément d'indice ;

Δc

La détermination de la masse molaire se fait par rapport à un étalon de masse molaire connue permettant d'éliminer le facteur k . Ici nous avons employé comme étalon la β -lactoglobuline $M_{\text{mol.}} = 35.000$ (préparée sous forme cristallisée au laboratoire de Biologie physico-chimique). Puisque nous travaillons en solution très diluée, le facteur B d'interaction des molécules est négligeable. En négligeant aussi le facteur de dépolarisation qui intervient d'une manière très faible, nous obtenons alors la formule suivante :

$$\frac{M_{\text{sol.}}}{M_{\text{étal.}}} = \lim_{\theta=0} \left[\frac{\lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{I}{c} \right)_{\text{sol.}}}{\lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{I}{c} \right)_{\text{étal.}}} \right] \cdot \frac{\left(\frac{\Delta n}{\Delta c} \right)^2_{\text{étal.}}}{\left(\frac{\Delta n}{\Delta c} \right)^2_{\text{sol.}}}$$

La concentration des solutions utilisées était inférieure à 0,15 mg/ml, nous nous trouvons sur la partie rectiligne de la courbe $I = f(c)$ permettant l'extrapolation à dilution infinie. La détermination de l'incrément d'indice

$\frac{\Delta n}{\Delta c}$ a été faite au moyen d'un réfractomètre de Zeiss ; les valeurs obtenues varient avec la dilution de 0,163 à 0,173 10^{-3} . Cette dispersion des résultats s'explique vraisemblablement par le fait que ces solutions n'ont pu être dialysées contre le solvant. Certains auteurs ayant trouvé des

chiffres variant de 0,171 à 0,177 10^{-3} ⁽⁵⁾, nous avons admis pour $\frac{\Delta n}{\Delta c}$

la valeur 0,170 10^{-3} , l'incrément d'indice de la β -lactoglobuline est égale à 0,190 10^{-3} . Toutes les solutions (solvant pur et β -LP) ont été soumises pendant 30 minutes à un champ d'accélération de 150.000 g (dans une ultracentrifugeuse Spinco pour éliminer les traces d'agglomérats).

On admet que l'intensité diffusée par le corps en solution est égale à la différence entre l'intensité diffusée par les solutions et l'intensité diffusée par le solvant. On commence par mesurer l'intensité diffusée par le

solvant pur, puis on ajoute les solutions de β -LP avec une micro-pipette, directement dans la cuve à diffusion; le mélange est assuré à l'aide d'un agitateur magnétique. La valeur de l'intensité est donnée en unité arbitraire par rapport à celle d'un cube en verre pris comme étalon secondaire.

Nous calculons les valeurs de $\frac{I}{c}$ pour l'angle $\theta = 90^\circ$ et de $\frac{\Delta n}{\Delta c}$ pour nos deux échantillons de β -LP. Par comparaison avec les valeurs données pour la β -lactoglobuline, nous en déduisons la masse molaire.

	$\frac{I}{c}$	$\frac{\Delta n}{\Delta c}$	M. mol.
β -lactoglobuline	0,37	0,190	35.000
β -LP 1	25	0,170	2.960.000
β -LP 2	27	0,170	3.200.000

Nous trouvons une masse molaire moyenne des lipoprotéines voisine de 3.000.000, valeur très proche de celle que d'autres auteurs ont obtenue pour les lipoprotéines $S_{f\ 1,063}$ (0 à 12) (5^{-71}).

b) Mise en évidence de la fixation de l'oléate de sodium sur la β -lipoprotéine.

Dans une première expérience, des quantités croissantes d'oléate de sodium ont été ajoutées au solvant pur (Br K) directement dans la cuve à diffusion à l'aide d'une microburette. La solution d'oléate contenue dans la microburette est une solution à 1 mg/ml. Après agitation du mélange avec l'agitateur magnétique, les mesures de l'intensité diffusée sont faites aux différents angles θ , de 140° à 40° . Nous constatons une augmentation de la lumière diffusée en fonction de la concentration en oléate, le calcul des coefficients de dissymétrie $\frac{I_\theta}{I_{\pi-\theta}}$ montre une augmentation très importante due à la formation d'associations micellaires entre les molécules d'oléate libre.

Dans une deuxième expérience, les mêmes quantités croissantes d'oléate de sodium ont été ajoutées à une solution de β -LP (0,19 mg/ml) dans les mêmes conditions. L'intensité de la lumière diffusée augmente avec la concentration en oléate et la dissymétrie suit cette augmentation régulièrement, même aux grandes concentrations d'oléate (15 mg p. 100 mg de β -LP).

Le tableau suivant présente ces résultats :

$\frac{I_\theta}{I_{\pi-\theta}}$	β -LP (5 ml)	β -LP (5 ml) +20 μ l oléate	Br K (5 ml) +20 μ l oléate	β -LP (5 ml) +30 μ l oléate	Br K (5 ml) +30 μ l oléate
70° - 110°	1,08	1,09	2,5	1,16	4
60° - 120°	1,12	1,18	3,36	1,26	10
50° - 130°	1,14	1,23	5,1	1,39	17,9
40° - 140°	1,21	1,34	7,1	1,5	29,4

On constate que les valeurs des coefficients de dissymétrie sont très différentes pour les solutions d'oléate avec et sans lipoprotéine. L'oléate n'existe donc pas à l'état micellaire libre dans les solutions de β -lipoprotéine. Ce résultat s'accorde avec notre hypothèse d'une fixation des molécules d'oléate sur les molécules lipoprotéiniques. Ces associations oléate- β -LP se comportent comme de nouvelles molécules.

c) Interprétation des résultats.

Certains auteurs ont admis que la β -LP était une molécule sphérique de diamètre 190 Å. Pour cette dimension, les coefficients de dissymétrie devraient être de 1, or nous les trouvons de 1,1. Nous devons donc admettre l'existence de quelques associations plurimoléculaires. Comment pouvons-nous envisager la fixation d'oléate sur une telle molécule ? En première approximation, l'augmentation de la masse molaire peut être estimée d'après l'augmentation de $\frac{I}{c}$ à 90°. Pour une addition de 300 mol. par mol. de β -LP, la masse molaire calculée de cette nouvelle molécule devrait

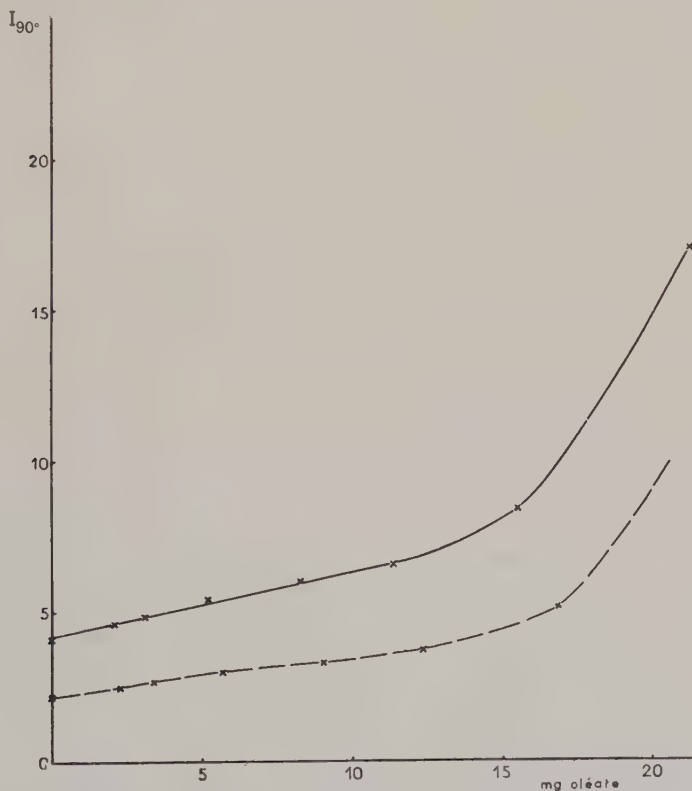


FIG. 19. — Variation de l'intensité diffusée à 90° en fonction de la concentration en oléate ;

Courbe ——— β -LP concentration 0,19 mg/ml ;

Courbe - - - β -LP concentration 0,097 mg/ml.

être de 3.090.000, sans compter l'addition probable d'eau à l'édifice; or d'après la valeur de l'intensité à 90° on trouve une masse molaire moyenne de 3.350.000. Il est peu vraisemblable que cette augmentation soit due à l'eau d'imbibition. Nous préférons admettre qu'à côté des molécules de β -LP—oléate, il existe des molécules plus grosses contenant deux ou plusieurs molécules de β -LP attachées entre elles par des molécules d'oléate servant de pont.

Pour expliquer l'homogénéité que l'on observe aussi bien à l'ultracentrifugation qu'à l'électrophorèse, il faut imaginer un équilibre rapide

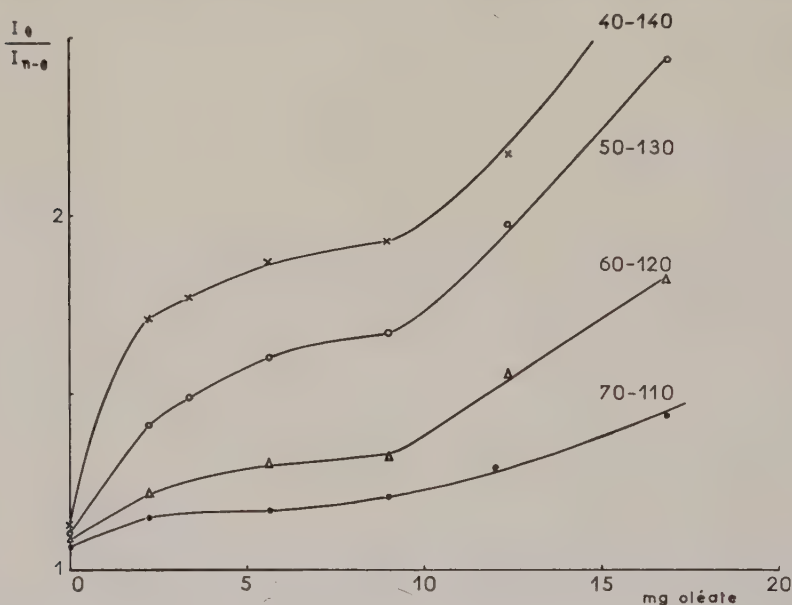


FIG. 20. — Variation du coefficient de dissymétrie en fonction de la concentration en oléate à plusieurs paires d'angles.

entre les cénapses de β -LP—oléate monomères et les associations plurimoléculaires.

Notons que cet équilibre se poursuit jusqu'à une concentration d'oléate assez forte (12 p. 100), concentration pour laquelle l'intensité diffusée augmente brusquement, comme le montre la figure 19. Nous avons représenté dans cette figure l'intensité diffusée à 90° en fonction de la concentration en oléate pour deux dilutions différentes de β -LP.

Si l'on admettait que l'association β -LP—oléate garde la forme initiale de la molécule de β -LP, la dissymétrie ne devrait pas augmenter aussi rapidement (d'après les abaques connus) ⁽²⁸⁾. Les courbes de la figure 20 montrent que, dès la concentration de 2 p. 100 d'oléate, les molécules sont nettement plus dissymétriques et ceci peut s'expliquer soit par une déformation de la molécule, soit plus vraisemblablement par des associations labiles des molécules en « chapelet ».

Une dissymétrie encore plus grande apparaît pour une concentration

supérieure à 10 p. 100 d'oléate. La déformation des molécules augmente sans doute sous l'influence de ces fortes concentrations d'oléate. L'hypothèse d'une formation de grosses micelles d'oléate libre est probablement exclue par les résultats d'expériences d'ultracentrifugations préparatives que nous rapporterons plus loin.

4° EXTRACTIBILITE DES LIPIDES PAR L'ETHER SOUS L'INFLUENCE DES SAVONS

Nous avons repris les expériences d'extractibilité des lipides par l'éther dans les conditions techniques décrites par Machebœuf et ses collaborateurs (⁴¹) qui sont les meilleures pour éviter la dénaturation par mousage et qui sont les plus reproductibles à une température déterminée.

Nous avons choisi un récipient pouvant nous donner une très grande surface de contact entre l'éther et la solution aqueuse sous une faible épaisseur de cette dernière. Nous avons donc utilisé pour 1 ml de lipoprotéine et 3 ml d'éther des ampoules à décantation de 60 ml disposées horizontalement.

A la fin de l'expérience, la couche éthérée est prélevée délicatement, sans redresser l'ampoule, à l'aide d'une pipette à bout effilé. L'ampoule est ensuite redressée doucement et les dernières gouttes d'éther sont récupérées avec la pipette. Deux portions complémentaires d'éther (3 ml) permettent de laver la surface (sans agitation de l'ampoule), la phase aqueuse est alors décantée par le bas dans un tube à centrifuger contenant 10 ml de mélange méthylal-méthanol (4-1) pour en extraire les lipides restants. En l'absence de détergents, la quantité de lipides extraits est très faible et dépend de la concentration de la lipoprotéine, comme nous le verrons dans les figures 21, 23, 24, 26.

A. Action de l'oléate de sodium.

a) *Extractibilité des lipides en fonction de la concentration en oléate.*

Dans 6 ampoules nous introduisons 1 ml de β -LP et des quantités d'oléate de sodium croissantes de 0 à 10 mg avec une solution d'oléate concentrée (10 p. 100) afin de ne pas augmenter notablement le volume. Le pH est compris entre 8 et 8,8.

Après avoir mélangé intimement, mais doucement, l'oléate à la solution, nous versons sur la paroi de l'ampoule 3 ml d'éther R.P. (fraîchement redistillé) très lentement afin d'éviter toute émulsion à la surface de contact et nous abandonnons les ampoules bouchées pendant 72 heures à la température du laboratoire (20 à 22°).

Nous pouvons suivre les diverses phases de l'extraction en observant l'aspect du mélange dans les ampoules au cours du temps.

L'extraction terminée, les liquides éthérés sont remis dans une fiole tarée et évaporés ; les lipides de la phase aqueuse sont extraits selon la technique de Delsal.

Dans les lipides ainsi obtenus, pesés, nous dosons le cholestérol total (C.T.), le phosphore (Pl.), les acides gras estérifiés (A.G.E.) par les méthodes déjà indiquées.

Les courbes d'extractibilité, pourcentage de chacun des constituants en fonction de la concentration en oléate, sont représentées sur la figure 21. Nous avons résumé dans un tableau (p. 45) les résultats obtenus (dosages

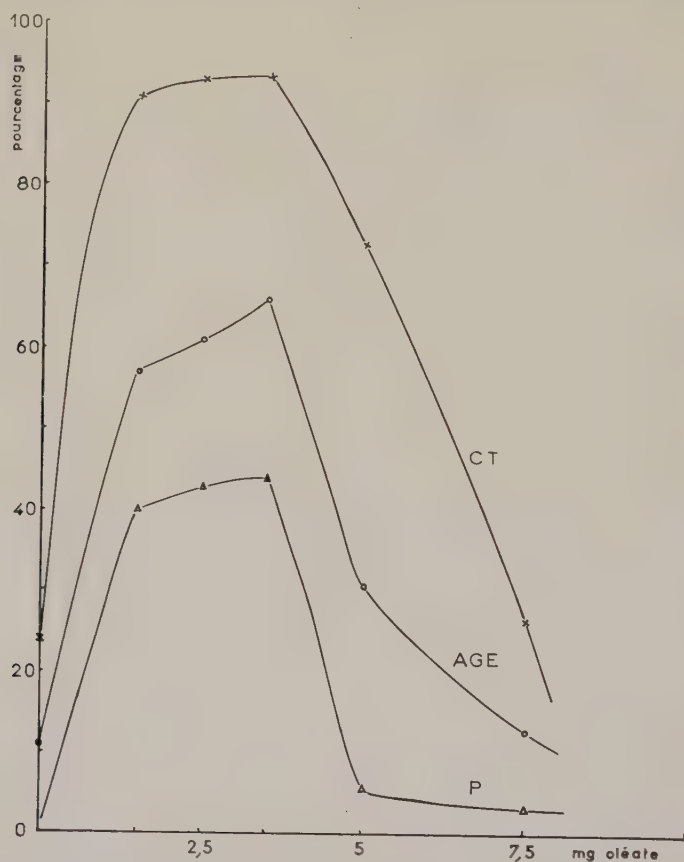


Fig. 21. — Courbes d'extractibilité des lipides de la β -LP en fonction de la concentration en oléate de sodium, (concentration de la β -LP : 15 mg/ml)

CT = cholestérol total ;
AGE = acides gras estérifiés ;
P = phosphore.

des constituants des lipides extractibles par l'éther, des lipides non extractibles) et nous avons noté l'aspect de chacune des ampoules au cours du temps pendant l'extraction.

La β -LP dont nous sommes partis était à la concentration de 15 mg/ml et sa composition était la suivante :

Protéines mg	Lipides mg	C.T. mg	Pl. μ g	A.G.E. μ eq
3	12,6	4,3	115	13

ASPECT	β -LP seule 1 ml	+ oléate 15 μ l	+ oléate 25 μ l	+ oléate 35 μ l	+ oléate 50 μ l	+ oléate 75 μ l
Départ . . .	trouble	trouble ++	trouble ++	trouble +	trainée trouble	légèrement trouble
4 heures .	trouble +	trouble ++	trouble ++	trouble	trouble	trouble
28 heures .	trouble ++	trouble +	trouble	opalescent	trouble +	trouble +
56 heures .	trouble +++	trouble +	trouble au fond	trouble au fond clair	trouble +	trouble +
72 heures .	trouble +++	trouble			trouble	trouble
QUANTITÉ D'OLÉATE	0	1,5 mg	2,5 mg	3,5 mg	5 mg	7,5 mg
<i>Extrait éthéré</i>						
Lipides mg.	1,7	8,9	9,5	11,1	6,4	3,4
C.T. mg . . .	1,0	3,9	4,0	4,0	3,2	1,1
Pl. μ g	—	48	49	50	6,7	5,8
A.G.E. μ eq .	1,4	7,4	7,9	8,6	4,1	1,8
<i>Extrait méthylal-méthanol</i>						
Lipides mg.	11	3,6	3,5	2,7	7,7	9,4
C.T. mg . . .	3,3	—	—	—	1,1	3,2
Pl. μ g	101	60	54	52	98	100
A.G.E. μ eq .	11,5	4,6	3,9	3,2	7,5	9,8
<i>Pourcentage extrait par l'éther</i>						
C.T.	24	91	93	93	73	27
Pl.	—	40	43	44	5,8	3,6
A.G.E.	11	57	61	66	31	13

Les courbes représentant le pourcentage des constituants passés dans l'éther montrent un maximum d'extraction à la dose de 3,5 mg d'oléate par ml de β -LP pour chacun des 3 constituants étudiés : cholestérol, acides gras estérifiés, phosphore. *A cette concentration, 94 p. 100 du cholestérol passe dans l'éther ainsi que 44 p. 100 des phospholipides et 66 p. 100 des acides gras estérifiés.*

b) Influence du temps de contact sur le passage des lipides.

L'aspect des ampoules au cours du temps nous indique que le passage des lipides dans l'éther n'est pas instantané. Pour préciser la cinétique de ce passage, nous avons pris 4 séries de six ampoules ; dans chaque série, nous avons introduit 1 ml de β -LP par ampoule et les mêmes quantités d'oléate de sodium que dans l'expérience précédente. Chaque série est décantée et analysée à des temps différents : 6, 24, 48 et 72 heures après la mise en contact avec l'éther.

Les courbes d'extractibilité de chacun des constituants passent par un maximum pour la même concentration en oléate. Nous avons représenté dans la figure 22 l'extraction du cholestérol en 6, 24, 48, 72 heures (courbe 1) et celle du phosphore (courbe 2). Les courbes représentant les acides gras estérifiés sont similaires. Ces courbes nous montrent qu'à la concentration optimale d'oléate, l'extraction des lipides est terminée en 6 heures. Pour les concentrations plus faibles d'oléate, l'extraction des lipides se fait plus lentement et le maximum n'est atteint qu'entre 48 et 72 heures. Pour les concentrations élevées en oléate pour lesquelles le

passage des lipides est entravé, la durée de contact a relativement moins d'influence.

Nous pouvons conclure de ces expériences que *l'extractibilité des lipides atteint un maximum qu'une plus longue durée de contact ne permet pas de dépasser et que le temps nécessaire pour atteindre ce maximum est d'autant plus grand qu'on s'éloigne de la concentration optimale.*

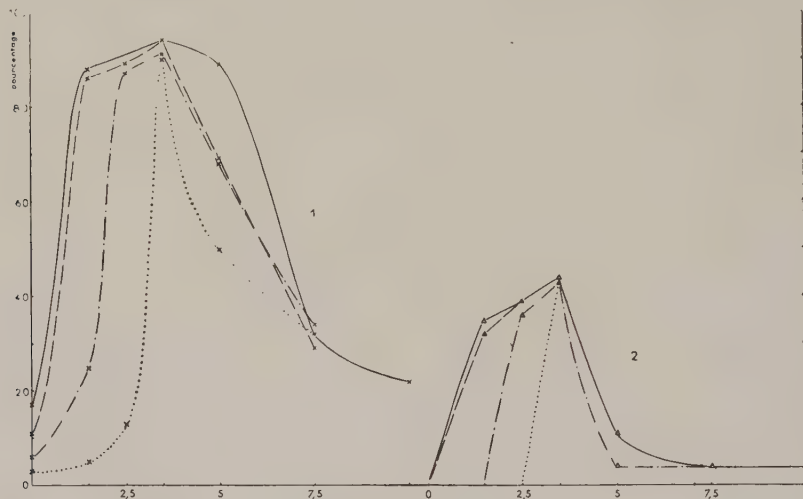


FIG. 22 — Courbes d'extractibilité des lipides de la β -LP en fonction de la concentration en oléate de sodium après plusieurs temps de contact ;
à gauche : extractibilité du cholestérol ;
à droite : extractibilité du phosphore.

Courbes — 72 h. Courbes — — 48 h. Courbes — — — 24 h. Courbes ... 6 h.

D'autre part, la forme de ces courbes nous montre qu'il existe bien une concentration optimale d'oléate pour laquelle l'extraction est maximale. Pour les quantités plus élevées d'oléate, l'extraction est nettement moindre : ceci est probablement dû à un masquage des lipides par l'excès de savon sur la lipoprotéine.

c) *Influence de la dilution de la β -lipoprotéine sur les conditions optimales de l'extractibilité.*

Le passage des lipides en fonction de la concentration de la β -LP a été étudié en diluant de moitié la β -LP précédente avec une solution saline de densité 1,019 identique à celle qui a servi à préparer la β -LP afin de ne pas changer les conditions de pH et de force ionique. Des quantités d'oléate croissantes ont été ajoutées et les extraits étherés dosés nous ont permis de construire les courbes (fig. 23) où l'optimum d'extractibilité se trouve à la concentration de 2,5 mg par ml de β -LP. Sont alors extraits : 100 p. 100 du cholestérol, 73 p. 100 des acides gras estérifiés et 44 p. 100 du phosphore.

Il existe donc un rapport stoechiométrique entre la quantité d'oléate à ajouter et la quantité de β -LP présente pour obtenir l'optimum d'extractibilité des lipides.

d) Influence des conditions extérieures subies par la β -LP avant l'étude de l'extractibilité.

Deux conditions particulières ont été étudiées pour leur influence sur la lipoprotéine.

1° La β -LP est conservée 24 heures en chambre froide à 4° C avant d'être soumise à l'extraction par l'éther en présence d'oléate.

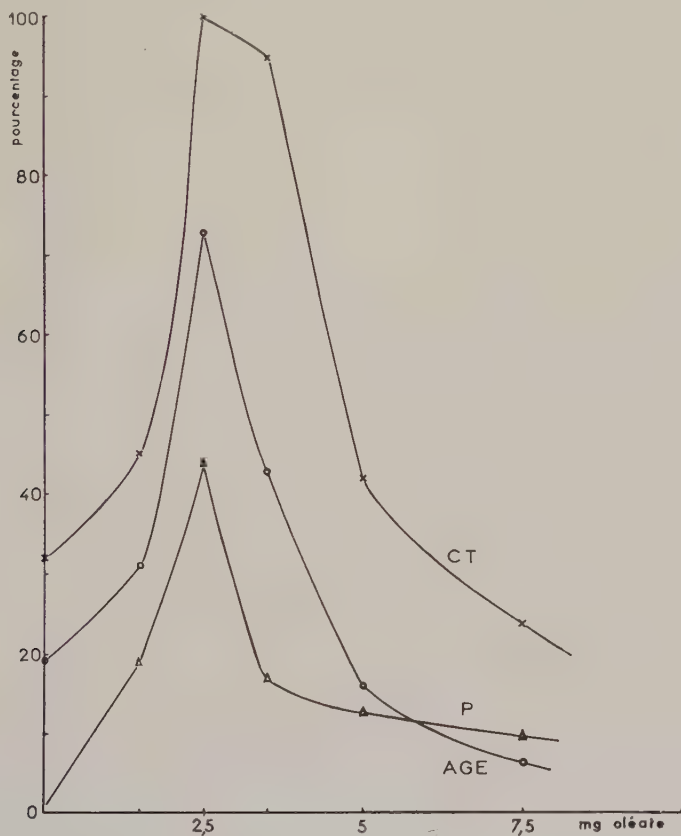


FIG. 23. — Courbes d'extractibilité des lipides de la β -LP en fonction de la concentration en oléate de sodium, (concentration de la β -LP : 7,5 mg/ml)

CT = cholestérol total ;

AGE = acides gras estérifiés ;

P = phosphore.

Qualitativement, elle semble stable (aspect extérieur, électrophorèse), la courbe d'extractibilité présente son maximum pour la même quantité d'oléate mais le pourcentage d'extraction est plus élevé, atteignant 100 p. 100 pour le cholestérol, 80 p. 100 pour les acides gras estérifiés et 45 p. 100 pour le phosphore.

Ces résultats semblent bien confirmer une légère transformation même à basse température de la β -lipoprotéine.

2° La β -LP est placée 24 heures à l'étuve à 37° C avant d'être soumise à l'extraction par l'éther en présence d'oléate.

Le pourcentage maximal d'extraction des constituants reste le même pour la même concentration optimale d'oléate : 95 p. 100 du cholestérol, 45 p. 100 du phosphore présent total. Mais, conformément à ce que nous avons déjà signalé plus haut, la quantité totale de phospholipides dosables a diminué d'environ 20 à 30 p. 100. Il semble que l'hydrolyse des phospholipides se produisant pendant l'incubation intéresse aussi bien les phospholipides extractibles que les phospholipides non extractibles.

e) *Etat et nature des lipides non extractibles.*

Quelles que soient les conditions maximales d'extractibilité des lipides, la phase aqueuse est claire, elle contient les protéines de la β -LP et la moitié des phospholipides non extraits dans ces conditions. L'électrophorèse sur papier en tampon pH 8,6 montre en effet une fraction, colorable par le bleu de bromophénol (protéines) et le noir Soudan (lipides), migrant avec une mobilité plus faible que la β -LP normale et partiellement dénaturée sous l'influence de l'éther ayant diffusé dans cette phase. *Les phospholipides non extractibles ne sont pas détachés de la lipoprotéine par l'oléate de sodium mais restent solidement fixés à la protéine.*

Nous avons essayé de voir s'il existait une différence de nature entre les phospholipides non extractibles et ceux qui passent dans l'éther. Pour cela, les lipides extraits dans l'éther et les lipides non extraits, mais séparés de la protéine par précipitation par le méthylal-méthanol, furent d'abord traités par l'acétone pour éliminer les lipides acétonosolubles (cholestérol, cholestérides et triglycérides). Chaque fraction a été disposée sur papier imprégné d'acide silicique à côté des phospholipides totaux (obtenus par précipitation de la β -LP totale par le méthylal-méthanol) utilisés comme témoin.

Après chromatographie par le mélange solvant diisobutylcétone-acide acétique-eau (40-25-5) ⁽⁵³⁾, la révélation à la rhodamine B montre les 3 taches principales, dans des proportions identiques, pour les lipides totaux et pour les deux fractions phospholipidiques.

Il n'y a donc pas de différence qualitative évidente entre les phospholipides extractibles et ceux qui ne le sont pas.

B. Action du zéphirol.

a) *Extractibilité des lipides en fonction de la concentration en zéphirol.*

Pour étudier l'action du zéphirol, nous avons opéré dans les mêmes conditions que précédemment pour l'oléate de sodium, à la température du laboratoire (20 à 22°). Des quantités croissantes de zéphirol (de 0 à 4 mg) ont été ajoutées à 1 ml de β -LP à partir d'une solution concentrée de zéphirol (10 p. 100). Les courbes d'extractibilité de chacun des constituants au bout de 24 heures sont représentées par la figure 24. Nous avons résumé dans un tableau (p. 50) les résultats obtenus et nous avons noté l'aspect de chacune des ampoules au cours du temps pendant l'extraction.

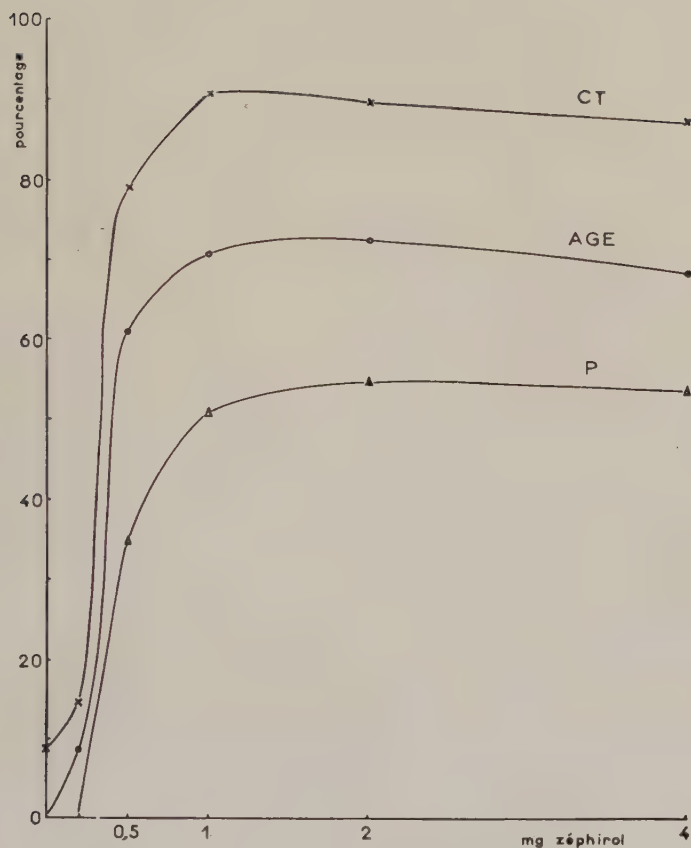


FIG. 24. — Courbes d'extractibilité des lipides de la β -LP en fonction de la concentration en zéphirol, (concentration de la β -LP : 15 mg/ml)

CT = cholestérol total ;
AGE = acides gras estérifiés ;
P = phosphore.

La β -LP dont nous sommes partis était à la concentration de 15 mg/ml et sa composition était la suivante :

Protéines mg	Lipides mg	C.T. mg	Pl. μ g	A.G.E. μ eq
2,2	12	4,8	89	12

Comme nous pouvons le voir, les courbes sont très différentes de celles obtenues après action de l'oléate de sodium ; elles présentent un palier pour les trois constituants étudiés, palier défini par une extraction de 90 p. 100 du cholestérol, 72 p. 100 des acides gras estérifiés et 55 p. 100 du phosphore, à partir de la quantité de 1 mg de zéphirol par ml de β -LP.

ASPECT	β -LP 1 ml	+zéphirol 2 μ l	+zéphirol 5 μ l	+zéphirol 10 μ l	+zéphirol 20 μ l	+zéphirol 40 μ l
Départ	opalescent	opalescent +	trouble	trouble +	trouble ++	trouble +++
6 heures .	trouble	trouble	trouble	opalescent++	opalescent +	opalescent + +↓
24 heures .	trouble +	trouble	opalescent	opalescent +dépôt	opalescent +↓	clair +↓
48 heures .	trouble ++	trouble	opalescent +dépôt	opalescent +↓	clair +↓	clair +↓
QUANTITÉ DE ZÉPHIROL	0	0,2 mg	0,5 mg	1 mg	2 mg	4 mg
<i>Extrait éthéré</i>						
Lipides mg.	2,5	2,8	7,7	9,3	10,8	10,4
C.T. mg ...	0,4	0,7	3,8	4,4	4,3	4,2
Pl. μ g	—	—	31	46	49	47
A.G.E. μ eq .	—	1,0	7,4	8,5	8,8	8,3
<i>Extrait méthylal-méthanol</i>						
Lipides mg.	9,9	10,0	4,7	3,7	3,8	5,8
C.T. mg ...	4,1	3,8	0,8	0,3	—	0,3
Pl. μ g	86	89	58	40	35	39
A.G.E. μ eq .	12,0	10,9	4,0	2,8	2,3	3,1
<i>Pourcentage extrait par l'éther</i>						
C.T.	8,5	14,5	79	91	90	88
Pl.	—	—	35	51	55	54
A.G.E.	—	8,5	61	71	73	69

b) Influence du temps de contact sur le passage des lipides.

Trois séries de 6 ampoules sont préparées dans les conditions déjà indiquées et chaque série est décantée et analysée au bout des temps suivants : 6, 24, 48 heures. Après dosage des constituants, les courbes d'extractibilité sont construites en fonction de la concentration en zéphirol. La figure 25 représente le pourcentage du cholestérol (courbe 1) et du phosphore (courbe 2) extraits aux temps 6, 24, 48 heures.

Au bout de 6 heures, l'extraction est loin d'être complète pour les quantités inférieures à 2 mg de zéphirol. Au bout de 24 et 48 heures, les courbes du phosphore sont superposables ; pour le cholestérol, il y a encore une légère amélioration de l'extraction pour la quantité de 0,5 mg. Les courbes correspondant aux acides gras estérifiés sont conformes aux résultats précédents.

c) Influence de la dilution de la β -lipoprotéine sur l'extractibilité.

La figure 26 montre les résultats obtenus avec une β -LP diluée de moitié avec une solution de densité 1,019.

En présence de 0,2 et 0,5 mg de zéphirol, le pourcentage des lipides extraits est plus élevé qu'avec la β -LP concentrée ; au bout de 24 heures, l'extraction n'est pas totale pour la quantité de 0,5 mg, mais il est probable qu'elle le serait au bout de 48 heures. Le résultat s'accorde (comme dans le cas de l'oléate) avec une action stoechiométrique du

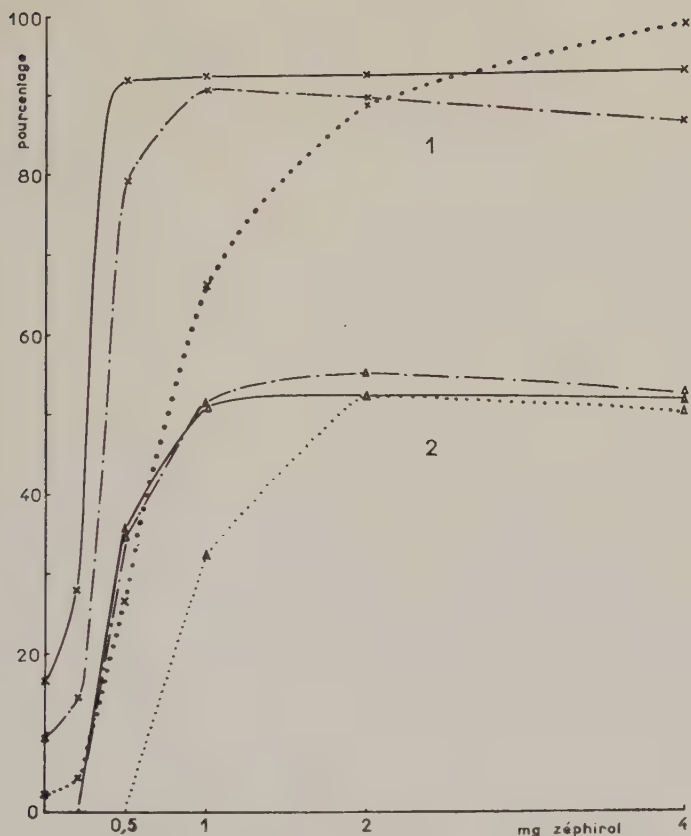


Fig. 25 — Courbes d'extractibilité des lipides de la β -LP en fonction de la concentration en zéphirol après plusieurs temps de contact ;
 en haut : extractibilité du cholestérol ;
 en bas : extractibilité du phosphore.
 Courbes — 48 h. Courbes - - - 24 h. Courbes 6 heures.

saponium sur la β -LP. De plus, nous remarquons que le maximum d'extraction atteint 100 p. 100 pour le cholestérol tandis qu'il reste de 55 p. 100 pour le phosphore.

d) Etat et nature des lipides non extractibles.

Sous l'action du zéphirol, quelles que soient les conditions, une même quantité de phosphore reste liée à la protéine. Dans les ampoules où le palier d'extraction est atteint, les phases aqueuses sont claires ; et l'électrophorèse sur papier, en tampon de pH 8,6, montre une fraction colorable par le bleu de bromophénol (protéines) et le noir Soudan (lipides), migrant avec une mobilité presque égale à celle de la β -LP seule, partiellement dénaturée au départ. Ceci nous prouve bien, comme

dans le cas de l'oléate, que les phospholipides non extractibles sont solidement fixés aux protéines.

Nous avons encore une fois confirmé qu'il n'y avait pas de différence

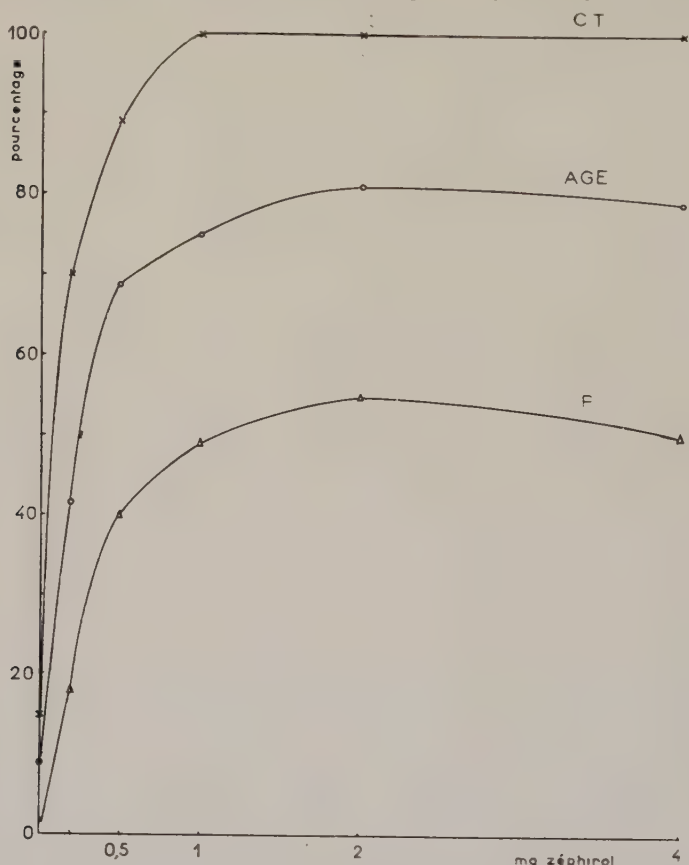


FIG. 26. — Courbes d'extractibilité des lipides de la β -LP en fonction de la concentration en zéphirol, (concentration de la β -LP : 7,5 mg/ml)

CT = cholestérol total ;
AGE = acides gras estérifiés ;
P = phosphore.

qualitative entre les phospholipides extractibles par l'éther et ceux non extractibles. Pour cela, nous avons comparé par chromatographie sur papier les phospholipides totaux, la fraction des phospholipides extractibles et la fraction des phospholipides non extractibles, et nous avons obtenu partout les trois mêmes taches caractéristiques des phospholipides totaux.

INTERPRETATION ET DISCUSSION

L'objet de notre travail comportait l'obtention d'une lipoprotéine assez pure pour nous permettre l'étude de l'influence des détergents.

Au moment où nous avons commencé ce travail, aucune fraction lipoprotéinique du sérum n'avait encore été suffisamment purifiée. Les méthodes d'ultracentrifugation nous ont apporté une technique physique aussi peu dénaturante que possible pour séparer les lipoprotéines. D'après les analyses d'ultracentrifugation de Gofman, il nous est apparu que la fraction de $S_{7,1,063}$ comprise entre 0 et 12 constituait une lipoprotéine définie, homogène, assez facile à séparer des autres lipoprotéines. Récemment le travail de Bjorklund ⁽⁵⁾ a montré qu'il s'agissait peut-être d'une famille de molécules très voisines ; de légères différences de masse molaire ont été trouvées entre les fractions supérieure, centrale et inférieure obtenues dans un tube d'ultracentrifugation avec un gradient de densité allant de 1,039 à 1,004 (2.700.000 à 3.080.000).

D'après les analyses de Shore ⁽⁷⁰⁻⁷¹⁾, la partie protéinique de ces molécules aurait la même masse molaire et les mêmes acides aminés N et C terminaux (Glu - NH₂ et Sér - COOH). Notre étude immunologique nous a également confirmé la spécificité et l'unicité de la protéine de notre fraction. Les différences entre les molécules de cette famille portent donc exclusivement sur la composition lipidique mais ces différences sont faibles et ne nous paraissent pas devoir influencer notablement sur les résultats de notre travail.

Ces différences expliquent sans doute l'aspect de nos diagrammes d'électrophorèse et d'ultracentrifugation qui, tout en présentant un seul pic, révèlent un certain degré d'hétérogénéité par sa légère dissymétrie.

Nos analyses nous ont par ailleurs révélé que la fraction β -lipoprotéinique principale du sérum, que nous avons isolée, était un peu variable suivant le sérum utilisé. La proportion de lipides varie dans les limites de 75 à 85 p. 100 ; la composition lipidique est elle-même variable dans de faibles limites : le rapport molaire cholestérol/phospholipides se trouve compris entre 3,4 et 3,8 et la proportion de glycérides peut varier de 7 à 12 p. 100. Notre β -lipoprotéine se présente à nous comme une macromolécule de masse molaire moyenne 3.000.000, contenant 20 p. 100 de glucoprotéines et 80 p. 100 de lipides. D'après la composition moyenne trouvée, il y aurait par « molécule » : 700 molécules de phospholipides, 750 molécules de cholestérol libre, 1.500 molécules d'ester de cholestéryle et 240 molécules de triglycérides. Le nombre de charges cationiques (choline) et anioniques (acide phosphorique) des lipides est donc approximativement de 700. Si nous nous référons aux analyses de Shore ⁽⁷⁰⁾ et de Brown ⁽⁹⁾ concernant les acides aminés de la protéine, nous trouvons environ 900 charges anioniques (acides aspartique et glutamique) et 600 charges cationiques (lysine, arginine, histidine). Il n'y a pas d'équivalence exacte entre les charges lipidiques et les charges protéiniques et nous pensons que les interactions ioniques entre ces deux constituants portent sur les charges négatives et positives de chacun

(acide phosphorique-lysine) (choline-acide aspartique ou glutamique). Il est assez remarquable que nous trouvons un rapport moléculaire de lécithine/cholestérol voisin de 1 ; ce rapport est conforme aux associations stoechiométriques connues de ces deux constituants et nous pourrions imaginer une disposition alternée lécithine-cholestérol libre analogue à celle que l'on a reconnue dans d'autres lipoprotéines naturelles analysées au microscope électronique (myéline, stromas de globules rouges) (18).

L'addition de petites quantités de détergent à la molécule lipoprotéinique, nous a montré, par électrophorèse sur papier, l'existence de nouvelles cénapses lipoprotéine-savon, dont nous avons pu définir certaines constantes physiques. En effet, ces lipoprotéines se comportent comme un constituant unique à l'électrophorèse ; les charges apportées par l'oléate COO^- augmentent la mobilité de la lipoprotéine à pH 8,6. Les études par ultracentrifugation nous apportent une confirmation de cette fixation de l'oléate à la β -LP, le pic obtenu montre que nous sommes encore en présence d'un seul constituant. Sa constante de flottation $S_{7,1,063}$ augmente, sa densité diminue en fonction de la quantité d'acides gras fixés.

Si nous schématisons cette fixation d'oléate de la manière suivante :



nous pouvons poser la question de la réversibilité de cette réaction.

L'expérience suivante nous a permis d'estimer l'affinité très grande du savon pour la lipoprotéine. Nous avons ajouté des quantités d'oléate allant de 0,1 à 2,5 mg à 1 ml de solution de β -LP (concentration 18 mg/ml). Chaque solution de β -LP—oléate a été déposée au fond d'un tube à centrifuger de 6 ml, contenant 4 ml de solution de bromure de potassium de densité 1,019. Au fond d'un tube témoin, nous avons déposé 1 ml de β -LP seule et dans un autre tube 1 ml de solution de bromure de potassium de densité 1,019 contenant 1 mg d'oléate. Après ultracentrifugation pendant 2 heures à grande vitesse (40.000 t/mn), nous avons découpé notre tube en 3 fractions, la partie supérieure 1 ml, la partie du milieu 3 ml et le fond du tube 1 ml. Dans ces conditions d'ultracentrifugation, l'oléate seul flotte intégralement à la surface du tube. Il était donc possible de mettre en évidence une fraction d'oléate libre dans les mélanges β -LP—oléate, la partie supérieure des tubes devant contenir cet oléate libéré. Nous avons dosé celui-ci par la méthode de P. May (54) (inhibition du complexe éosine-albumine). Sauf dans le tube témoin, nous n'avons pas trouvé d'oléate libre même pour la dose de 2.500 μg . La précision de la mesure nous permet d'affirmer que moins de 50 μg d'oléate se trouve libéré de la cénapse en 2 heures d'ultracentrifugation. Une confirmation nous a encore été apportée par l'étude de l'extractibilité des lipides sur la β -LP—oléate recueillie au fond du tube d'ultracentrifugation. La courbe d'extraction des lipides en fonction de la concentration en oléate est superposable à celle des témoins ultracentrifugés nous prouvant que tout l'oléate était resté fixé sur la lipoprotéine. Le passage des lipides dans l'éther commence pour la quantité de 1,5 mg d'oléate.

Toutefois, cette fixation du savon ne correspond pas à une combi-

naison irréversible comme nous le démontrent les expériences suivantes. Nous avons préparé des associations β -LP—oléate contenant 0,6 mg et 0,8 mg d'oléate pour 18 mg de β -LP et nous les avons mélangées avec une β -LP pure (vol/vol). L'analyse électrophorétique des solutions nous montre que le mélange se comporte comme une fraction homogène de mobilité intermédiaire à celles des deux préparations constituantes. Ce résultat visible sur papier a été vérifié par électrophorèse en veine liquide. Le pic de β -LP a une mobilité de $3,7 \cdot 10^{-5}$ cm/s/v/cm ; celui d'une association d'oléate et de β -LP (0,5 mg/20 mg) a une mobilité très différente égale à $7,5 \cdot 10^{-5}$ cm/s/v/cm. Le mélange de ces deux solutions présente un seul pic qui se situe dans une position intermédiaire avec une mobilité égale à celle de l'association oléate— β -LP (0,25 mg/20 mg). On peut donc affirmer qu'il ne reste pas de β -LP seule ni de β -LP riche en oléate dans le mélange.

Il y a donc certainement une équilibration rapide entre les différentes cénapses de β -LP—oléate et un passage des molécules d'oléate d'une molécule de β -LP à une autre, malgré la quantité négligeable d'oléate libre dans la solution.

D'après les expériences d'électrophorèse et d'ultracentrifugation, il semble que l'addition des faibles quantités d'oléate ne s'accompagnent pas d'une modification importante de la taille des molécules. La faible variation des constantes de sédimentation et de flottation rend peu vraisemblable la formation d'agrégats par soudure de plusieurs molécules, ou la dissociation en fragments de masse molaire plus faible, si ce n'est en quantité négligeable.

Nous avons cherché des arguments complémentaires pour étayer notre hypothèse au moyen de la diffusion de la lumière. Ces expériences nous ont montré que les dimensions de la molécule de β -LP varient peu pour les quantités d'oléate inférieures à 10 mg/100 mg de β -LP. Elles ont confirmé d'autre part que les micelles d'oléate ajoutées à la solution sont dissociées et que les molécules en sont dispersées et fixées sur les molécules de β -LP. En effet, la diffusion de la lumière est beaucoup plus faible pour les associations β -LP—oléate que pour les micelles d'oléate libre. L'augmentation du coefficient de dissymétrie pour ces faibles concentrations d'oléate est en faveur d'une formation de polymères en petites quantités par association de plusieurs molécules de β -LP—oléate. Étant donné que ces polymères n'apparaissent pas à l'ultracentrifugation, nous pensons à un équilibre rapide entre ces formes monomères et polymères, ou que ces derniers existent en trop faible quantité.

Pour les quantités d'oléate supérieures à 10 mg/100 mg de β -LP, la dissymétrie des molécules augmente notablement : nous pensons que ceci résulte d'une déformation de la β -LP plutôt que d'une formation d'agrégats, étant donnée la variation relativement faible de la vitesse de sédimentation.

Les hypothèses de Machebœuf impliquaient bien une fixation des savons sur les lipoprotéines mais aussi un déplacement des lipides stoechiométriquement. Nos expériences nous démontrent, au contraire, qu'il n'y a aucune dissociation des lipides de la β -LP pour les quantités de savons qui se fixent sur cette dernière. Les électrophorèses (fig. 16, 17)

nous ont révélé que les lipides accompagnent les protéines dans leur migration. Les ultracentrifugations, des associations β -LP—oléate ne nous ont pas non plus permis de recueillir des lipides, libérés de ces lipoprotéines. Les quantités d'oléate qui permettent la délipidation par l'éther sont notablement plus élevées et ne correspondent pas à un déplacement stoechiométrique simple.

Examinons maintenant les résultats obtenus quant à l'extractibilité des lipides par l'éther en présence de détergents, et tout d'abord de détergents anioniques. La quantité de lipides, extraits par l'éther, par rapport à la quantité totale, varie selon la catégorie de lipides envisagés. L'éther entraîne 95 p. 100 du cholestérol et seulement 45 p. 100 des phospholipides. Les triglycérides, dont le taux a été estimé à partir du dosage des acides gras estérifiés, suivent le sort du cholestérol. Malgré ces différences, nous constatons que les phospholipides et le cholestérol sont détachés ensemble. Le maximum d'extraction est obtenu pour le cholestérol et pour les phospholipides avec la même quantité d'oléate. Le rapport phospholipides/cholestérol dans l'éther est sensiblement le même quel que soit le taux de lipides extraits. D'autre part, la vitesse d'extractibilité dépend de la quantité d'oléate. Avec la quantité optimale, les lipides sont extraits en 6 heures tandis qu'avec des quantités plus faibles d'oléate, le maximum d'extraction n'est atteint qu'au bout de 72 heures. Tant que la quantité d'oléate est faible, nous avons vu qu'elle ne déforme pas la molécule de β -LP, et l'extraction dans l'éther est à peu près nulle, comme pour la β -LP seule ; le passage des lipides dans l'éther nécessite une quantité d'oléate minimale de 0,1 mg/mg de β -LP (1.000 mol./mol. de β -LP). Le maximum d'extraction est obtenu pour l'addition de 2.000 mol. d'oléate à 1 mol. de β -LP (masse molaire 3.000.000). Avec cette cénapse très riche en oléate, la diffusion de la lumière nous a révélé une déformation probable des molécules, et l'électrophorèse sur papier ou sur gel d'amidon nous confirme cette altération de la β -LP, dont la plus grosse partie reste sur la ligne de départ. L'extraction porte alors sur la presque totalité du cholestérol (700 à 750 mol. de cholestérol libre, 1.400 à 1.500 mol. d'esters de cholestéryle), des triglycérides (200 à 250 mol.), et sur 45 p. 100 des phospholipides, soit environ 300 à 350 mol. de phospholipides.

Etant donné la forme des courbes d'extraction en fonction de la quantité d'oléate, il n'y a pas d'équivalence exacte entre le nombre de molécules d'oléate et le nombre de molécules détachées. Il n'y a pas non plus d'équivalence entre le nombre de molécules anioniques d'oléate et le nombre de phospholipides anioniques déplacés. *Ces résultats ne sont donc pas en accord avec l'hypothèse d'un déplacement des lipides par l'oléate.*

Nous imaginons plutôt le mécanisme d'action de la façon suivante : la β -LP protégée par l'enveloppe hydrophile ne permet pas aux gouttelettes d'éther diffusant dans l'eau d'extraire ses lipides. Les faibles quantités de détergent se fixent sur la molécule sans la déformer et l'éther ne peut encore atteindre les lipides. Lorsque les molécules d'oléate deviennent assez nombreuses pour déformer la lipoprotéine, le contact devient possible entre l'éther et les lipides, et les molécules étalées à l'interface eau-éther cèdent facilement leurs lipides.

Nous pouvons nous expliquer ainsi l'extraction presque totale du cholestérol. Mais il nous reste à comprendre pourquoi l'extraction des phospholipides est partielle. On aurait pu penser à une différence de solubilité, certains phospholipides étant plus hydrosolubles, comme la lysolécithine. Or l'expérience nous a montré qu'il n'y avait qualitativement aucune différence entre les phospholipides extraits et les phospholipides non extraits. Nous pensons donc que les phospholipides restants sont liés à la protéine par des liaisons plus fortes ; en effet, ils migrent à l'électrophorèse sur papier, après délipidation par les savons, au même niveau que les protéines.

L'action des détergents cationiques diffère peu de celle de l'oléate, en ce sens que la proportion des lipides extractibles par l'éther est à peu près la même. Ce résultat nous paraît exclure l'hypothèse d'un déplacement homoionique. De plus, nous avons vu que la quantité de zéphirol nécessaire pour la délipidation est nettement inférieure à celle de l'oléate. Ici encore la quantité de zéphirol (0,03 mg/mg de β -LP ou 300 mol./mol. de β -LP), qui permet le passage des lipides dans l'éther, entraîne une déformation de la molécule de β -LP : l'altération de la β -LP devient perceptible à l'électrophorèse à partir de 0,025 mg de saponium/mg de β -LP.

L'extraction en présence de zéphirol s'effectue nettement plus vite qu'avec l'oléate ; avec les faibles concentrations de zéphirol, il suffit de 48 heures pour obtenir le passage maximal des lipides dans l'éther, et avec une quantité de 0,07 mg/mg de β -LP l'extraction est déjà faite en 6 heures.

Les courbes d'extractibilité en présence d'oléate et de zéphirol diffèrent peu cependant par ailleurs ; dans la zone d'un excès de détergent, le zéphirol donne un plateau, tandis que les courbes descendantes obtenues avec l'oléate indiquent une inhibition qui devient très vite presque totale pour des quantités plus élevées. Au-delà d'une certaine concentration, le zéphirol également ne permettrait plus le passage des lipides dans l'éther : nous avons cherché à préciser les raisons de cette inhibition.

Pour cela, nous avons soumis à l'extraction par l'éther (dans les mêmes conditions expérimentales que la β -LP) une émulsion de lipides dans une solution de chlorure de sodium et bromure de potassium de densité 1,019 ; et une émulsion de lipides dans une solution de protéines délipidées. Les lipides utilisés sont des lipides totaux extraits d'un sérum par le méthylal-méthanol, les protéines sont celles d'un sérum délipidé par ultracentrifugation dans un milieu de densité 1,21, cette solution de protéines ayant été dialysée 48 heures contre la solution saline de densité 1,019.

4 séries d'ampoules sont préparées : la première série contient 10 mg de lipides émulsionnés dans 1 ml de solution en présence de quantités croissantes d'oléate de sodium (0 à 7,5 mg), la deuxième série contient la même solution de lipides en présence de quantités croissantes de zéphirol (0 à 4 mg), la troisième série contient la même quantité de lipides émulsionnés dans 1 ml de solution protéique en présence d'oléate, la quatrième série contient lipides et protéines en présence de zéphirol. Au bout de 24 heures pour celles contenant l'oléate de sodium, nous avons

dosé dans l'éther et dans la phase aqueuse de chaque ampoule les différentes catégories de lipides.

	PHASE ÉTHÉRÉE			PHASE AQUEUSE		
	C.T. mg	Pl. µg	A.G.E. µeq	C.T. mg	Pl. µg	A.G.E. µeq
Lipides	2,1	22	5,8	0,8	90	2,7
Lipides + 35 µl d'oléate à 10 p. 100	1,0	3,1	4	1,9	112	4,6
Lipides + 75 µl d'oléate à 10 p. 100	1,1	3,1	3,8	1,8	115	4,2
Lipides + protéines	2,9	88	11,2	0,08	4	0,5
Lipides + protéines + 35 µl d'oléate à 10 p. 100	2,8	92	11,8	0,05	ε	0,3
Lipides + protéines + 75 µl d'oléate à 10 p. 100	2,9	72	11,0	0,04	18	0,7
Lipides	2,1	13,8	6,2	0,8	89	2,4
Lipides + 10 µl de zéphirol à 10 p. 100	1,7	15,2	7,3	1,0	89	2,6
Lipides + 40 µl de zéphirol à 10 p. 100	1,4	1,1	5,8	1,3	101	3,5
Lipides + protéines ...	2,9	87	11,2	0,10	3	0,3
Lipides + protéines + 10 µl de zéphirol à 10 p. 100	2,8	92	11,1	0,07	ε	0,09
Lipides + protéines + 40 µl de zéphirol à 10 p. 100	2,9	97	11,2	0,10	ε	0,5

1° Les lipides seuls sont relativement mal extraits par l'éther (en particulier les phospholipides) ;

2° L'addition d'oléate entrave cette extraction dès le seuil de 2,5 mg ;

3° La présence des protéines sériques favorise considérablement le passage dans l'éther ;

4° L'addition d'oléate en présence de protéines exerce une action inhibitrice beaucoup plus faible qu'en l'absence de protéines.

Nous pouvons en conclure, d'abord, que les lipides de la β -LP ne se comportent pas comme des lipides libres, deuxièmement que la protéine de la β -LP ne favorise pas le passage des lipides dans l'éther comme le font les autres protéines sériques, troisièmement qu'en présence de 3,5 mg d'oléate l'extraction est meilleure pour les lipides de la β -LP que pour les lipides libres ; ceci ne peut s'expliquer que par une neutralisation de l'oléate par la protéine de la β -LP ; enfin l'excès d'oléate a certainement un effet inhibiteur sur le passage des lipides dans l'éther, effet qui se manifeste d'autant plus qu'il y a moins de protéines dans le milieu.

L'addition de zéphirol entrave également le passage des lipides dans l'éther et très particulièrement celui des phospholipides. On peut s'étonner que le zéphirol manifeste si peu son pouvoir inhibiteur dans l'extrac-tibilité des lipides libres.

Le zéphirol, comme l'oléate, permet le passage dans l'éther de la presque totalité du cholestérol de la β -LP, mais le maximum d'extraction des phospholipides reste voisin de 50 p. 100 (55 p. 100 du phosphore dans le cas du zéphirol, 45 p. 100 dans le cas de l'oléate). Dans les deux cas, il n'y a pas de différence qualitative entre les lipides extraits et les phospholipides résiduels, ce résultat nous paraît confirmer qu'une moi-tié des phospholipides se trouve attachée à la protéine par des liaisons particulières.

Il est possible que ces données puissent être un jour interprétées lorsque nous connaissons précisément la disposition stérique des différents cons-tituants d'une β -LP.

CONCLUSIONS

Afin d'étudier l'action des détergents sur les lipoprotéines, nous avons isolé (par ultracentrifugation fractionnée) et analysé une β -lipoprotéine pure à partir du sérum humain.

Cette β -lipoprotéine a une masse molaire voisine de 3.000.000. La densité à 20° de la molécule hydratée dans un milieu salin (BrK, ClNa), où sa vitesse de sédimentation est nulle, est de 1,040. Sa mobilité électrophorétique à pH 8,6 est de $3,7 \cdot 10^{-5}$ cm/s/v/cm; le pH isoélectrique mesuré en tampon acétate se trouve aux environs de 5,7. La vitesse de flottation à dilution infinie dans un milieu de densité 1,063 est égale à 4,9 unités Svedberg; la constante k déterminant l'amplitude de l'effet retard dû à la concentration est dans ces mêmes conditions de 11,2 ml/g.

Sa composition l'apparente à la β -LP ($S_{1,063}$ 0 à 12) isolée par Gofman (23-25), elle contient en moyenne 20 p. 100 de protéines et 80 p. 100 de lipides. Nous avons mis en évidence la présence de glucides (1 à 2 p. 100 des protéines). Par hydrolyse et chromatographie nous avons révélé principalement le mannose et le galactose et de petites quantités de fucose et d'acide sialique. Cette β -lipoprotéine est donc une gluco-lipoprotéine.

La chromatographie des lipides sur acide silicique nous a permis de préciser leur composition : cholestérol total 27 à 30 p. 100 (cholestérol estérifié 20 à 22 p. 100, cholestérol libre 8 à 10 p. 100), triglycérides 7 à 12 p. 100, phospholipides 16 à 20 p. 100. Ces phospholipides analysés par chromatographie comprennent principalement deux fractions choliques : la première est une lécithine (acide gras/phosphore = 2); la seconde, qui est la plus importante, de nature indéterminée, contient de la sphingosine, des acides gras estérifiés, de l'acide phosphorique, de la choline et des acides aminés.

D'autres phospholipides secondaires ont été mis en évidence : parmi ceux-ci, nous avons reconnu la présence de lysolécithine (10 p. 100 des phospholipides).

En étudiant la stabilité de notre β -LP en solution dans des conditions d'aération et de température variée, nous avons montré qu'il était possible de la conserver ou de la purifier par dialyse, à condition de la protéger de l'oxydation.

L'incubation de la β -LP à 37° C amène une transformation partielle des lipides (diminution des phospholipides, augmentation du cholestérol estérifié), l'incubation à l'air s'accompagne d'une oxydation et d'une augmentation de la mobilité électrophorétique.

Une étude immunologique nous a apporté un nouveau critère de pureté de notre lipoprotéine, puisqu'elle ne donne qu'une ligne de précipitation vis-à-vis d'un sérum de Cheval anti-sérum humain nor-

mal, et vis-à-vis d'un sérum de Lapin que nous avons immunisé contre notre préparation; de plus, ce sérum de Lapin anti- β -LP ne donne qu'une ligne de précipitation avec le sérum humain normal.

Nous avons étudié l'action des détergents anioniques (oléate de sodium) et cationiques (zéphirol) sur la β -lipoprotéine. La fixation d'oléate sur la β -LP augmente sa mobilité électrophorétique à pH 8,6, mais sur papier cette accélération est très peu sensible car la présence d'oléate dans la β -LP augmente considérablement le freinage; en veine liquide, l'addition de 0,5 mg d'oléate à 20 mg de β -LP porte la mobilité de $3,7$ à $7,5 \cdot 10^{-5}$ cm/s/v/cm. Le zéphirol, en neutralisant les charges négatives de la β -LP, l'insolubilise dès l'addition de 0,3 mg pour 20 mg de β -LP.

Cette fixation d'oléate sur la β -LP est aussi révélée par ultracentrifugation; la densité des complexes obtenus a été déterminée: cette densité passe de 1,040 à 1,0365 pour une concentration de 0,5 mg d'oléate pour 16 mg de β -LP. A cette concentration, la vitesse de flottation à dilution infinie en solution de densité 1,063 a une valeur plus élevée que la vitesse de flottation de la β -LP seule.

Au moyen de la diffusion de la lumière, nous avons pu confirmer l'existence de l'association de la β -LP et de l'oléate. L'oléate seul présente une diffusion très intense par suite de son état micellaire. Or, en présence de la protéine, la diffusion est faible, légèrement supérieure à celle de la β -LP, prouvant que l'oléate se disperse sur les molécules de β -LP. La dissymétrie faible pour la β -LP seule augmente avec la quantité d'oléate ajoutée; ce fait est en faveur d'une fixation des molécules d'oléate sur la β -LP, entraînant une polymérisation partielle réversible et une déformation des molécules de β -LP.

Cette déformation de la β -lipoprotéine en présence de savons anioniques et cationiques nous permet de comprendre le seuil d'extractibilité des lipides par l'éther en fonction de la quantité de détergent ajouté. Les faibles quantités de détergent ne permettent pas l'extraction des lipides par l'éther dans les conditions définies par Machebœuf⁽⁴¹⁾ (ampoules à décantation non agitées). A partir de 1,5 mg d'oléate ou de 0,5 mg de zéphirol pour 15 mg de β -LP, l'éther extrait une quantité importante de lipides. Avec la quantité optimale de 3,5 mg d'oléate pour 15 mg de β -LP, la totalité du cholestérol et des glycérides et 45 p. 100 des phospholipides sont extraits par l'éther. Avec une quantité de 1 mg de zéphirol, la lipoprotéine est délipidée de la même façon: 100 p. 100 du cholestérol et des glycérides et 55 p. 100 des phospholipides passent dans l'éther. Des quantités plus élevées de détergent inhibent le passage des lipides dans l'éther. Cette action inhibitrice est plus sensible pour l'oléate que pour le zéphirol.

La fraction des phospholipides qui passe dans l'éther n'est pas qualitativement différente de celle qui reste attachée à la β -LP.

La délipidation n'est pas un phénomène instantané: la vitesse de passage dans l'éther est différente selon le détergent (plus rapide avec le zéphirol) et selon la quantité de détergent (le passage le plus rapide étant obtenu pour la quantité optimale de détergent permettant la délipidation maximale).

La quantité optimale de détergent dépend de la concentration de la β -LP : il existe donc une relation à peu près stoechiométrique entre la quantité de détergent et la quantité de protéines présentes.

En aucun cas, les lipides ne sont détachés de la protéine en phase aqueuse. L'action des détergents doit donc être interprétée, non comme un décollement icéломorphique (c'est-à-dire le déplacement d'une molécule par une autre de forme presque identique), mais comme une déformation de la cénapse lipoprotéinique permettant à l'éther d'arracher les lipides. Une moitié des phospholipides se trouve inextractible, sans doute en raison de liaisons plus difficiles à rompre avec les protéines.

BIBLIOGRAPHIE

1. BAAR (S.) et BULL (J.P.). — *Nature* 1953, 172, 414.
2. BAUER (F.) et HIRSCH (E.). — *Arch. Biochem.*, 1949, 20, 242.
3. BERNARD DE L.— *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1958 40, 161.
4. BISERTE (G.) et HAVEZ (R.). — *Cancérologie*, 1955, tome II, fasc. 5.
5. BJORKLUND (R.) et KATZ (S.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, 78, 2122.
6. BLIX (G.), TISELIUS (A.), SVENSSON (H.). — *J. Biol. Chem.*, 1941, 137, 485.
7. BOURRILLON (R.) et MICHON (J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1959, 41, 267.
8. BREGOFF (H.M.), ROBERTI (E.), DELWICHE (C.). — *J. Biol. Chem.*, 1951, 33, 784.
9. BROWN (R.K.), DAVIS (R.E.), CLARKE (B.) et VAN VUNAKIS (H.). — III^e Colloque International sur la biochimie des lipides, 1956, p. 104.
10. BURSTEIN (M.). — *C.R. Ac. Sc.*, 1955, 240, 1022.
11. CHRISTENSEN (N.H.). — *J. Biol. Chem.*, 1939, 129, 531.
12. DELSAL (J.L.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1944, 26, 99.
13. DERVICHIAN (D.G.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1946, 28, 419. — III^e Colloque International sur la biochimie des lipides, 1956, p. 21.
14. DOUSTE-BLAZY (L.). — *C.R. Ac. Sc.*, 1954, 239, 460.
15. DOUSTE-BLAZY (L.), POLONOVSKI (J.), VALDIGUIE (P.). — *C.R. Ac. Sc.*, 1952, 235, 1643. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1956, 38, 19.
16. DUCET (G.) et KAHANE (E.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1946, 28, 794.
17. DURRUM (E.), PAUL (M.), SMITH (E.). — *Science*, 1952 116, 428.
18. ENGSTROM (A.) et FINEAN (J.B.). — *Biological ultrastructure*, Academic Press Inc. publishers New York, 1958.
19. ETIENNE (J.) et POLONOVSKI (J.) — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1959, 41, 805.
20. FILLERUP (D.L.) et MEAD (J.F.). — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1953, 83, 574.
21. GERMYN (M.A.) et ISHERWOOD (F.A.). — *Biochem. J.*, 1949, 44, 402.
22. GOFMAN (J.W.), DE LALLA (O.). — *Methods of Biochem. Analysis*, Ed. Glick. New York, 1954, vol. I.
23. GOFMAN (J.W.), DE LALLA (O.) GLAZIER (F.), FREEMAN (N.K.), LINDGREN (F.T.), NICHOLS (A.V.), STRISOWER (B.Y.), TAMPLIN (A.R.). — *Plasma*, 1954, 2, 413.
24. GOFMAN (J.W.), LINDGREN (F.T.), ELLIOTT (H.). — *J. Biol. Chem.*, 1949, 179, 973.
25. GOFMAN (J.W.), LINDGREN (F.T.), FREEMAN (N.K.), NICHOLS (A.V.). — III^e Colloque International sur la biochimie des lipides, Bruxelles, 1956, p. 224.
26. GORDON (R.S.). — *J. Clin. Invest.*, 1955, 34, 477.
27. GUINAND (S.) et JOLIOT (P.). — *J. Chim. Phys.*, 1957, 54, 239.
28. GUINAND (S.) et TONNELAT (J.). — *J. Chim. Phys.*, 1952, 49, 481.
29. GUINAND (S.) et TONNELAT (J.). — *J. Chim. Phys.*, 1954, 51, 276.
30. HARDY (W.B.) et GARDINER (S.). — *J. Physiol.*, 1910, 40, LXVIII.
31. HAVEL (R.J.), EDER (H.A.), BRAGDON (J.H.). — *J. Clin. Invest.*, 1955, 34, 1345.
32. HILLYARD (L.A.), ENTENMAN (C.), FEINBERG (H.), CHAIKOFF (I.L.). — *J. Biol. Chem.*, 1955, 214, 79.

33. HOPPE-SEYLER. — Handb. Phys. Chem., 1870, 3, 196.
34. HORROCKS (R.H.) et MAXING (G.B.). — *Lancet*, 1949, 256, 1042.
35. JARRIER (M.) et POLONOVSKI (J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1955, 37, 495.
36. KLEVSTRAND (R.) et NORDAL (A.). — *Acta Chim. Scand.*, 1950, 4, 1320.
37. KUNKEL (G.), SLATER (R.J.). — *J. Clin. Invest.*, 1952, 31, 677.
38. LEWIS (L.A.), GREEN (A.A.), PAGE (I.H.). — *Amer. J. Physiol.*, 1952, 171, 391.
39. MACHEBŒUF (M.). — Thèse de Sciences, Paris, 1929.
40. MACHEBŒUF (M.). — *Exp. Ann. Bioch. Méd.*, 1945, 5, 71.
41. MACHEBŒUF (M.). — *Blood Cells and Plasma Proteines*, Acad. Press, Ed. New York, 1953, p. 358.
42. MACHEBŒUF (M.) et DELSAL (J.L.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1942, 24, 296.
43. MACHEBŒUF (M.) et DELSAL (J.L.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1943, 25, 116.
44. MACHEBŒUF (M.) et POLONOVSKI (J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949, 31, 125.
45. MACHEBŒUF (M.) et REBEYROTTE (P.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1944, 26, 475.
46. MACHEBŒUF (M.), REBEYROTTE (P.), DUBERT (J.M.), BRUNERIE (M.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1953, 35, 334, 346.
47. MACHEBŒUF (M.) et SANDOR (G.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1932, 14, 1168. — *C. R. Ac. Sc.*, 1932, 194, 1102.
48. MACHEBŒUF (M.) et TAYEAU (F.). — *C.R. Ac. Sc.*, 1938, 206, 860.
49. MACHEBŒUF (M.) et TAYEAU (F.). — *C.R. Ac. Sc.*, 1938, 129, 1184. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1941, 23, 31.
50. MARINETTI (G.V.), ERBLAND (J.), ALBRECHT (M.), STOTZ (E.). — *Bioch. Bioph. Acta*, 1957, 25, 130.
51. MARINETTI (G.V.), ERBLAND (J.), STOTZ (E.). — *J. Biol. Chem.*, 1958, 233, 562.
52. MARINETTI (G.V.), SCARAMUZZINO (D.J.), STOTZ (E.). — *J. Biol. Chem.*, 1957, 224, 819.
53. MARINETTI (G.V.), STOTZ (E.). — *Bioch. Bioph. Acta*, 1956, 21, 168.
54. MAY (P.). — *C.R. Ac. Sc.*, 1957, 245, 2551.
55. MORA (R.), POLONOVSKI (J.), REBEYROTTE (P.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1953, 37, 957.
56. MOORE (D.) et WHITE (R.). — *Rev. Sc. Inst.*, 1948, 19, 700.
57. ONCLEY (J.L.), GURD (F.R.N.), MELIN (M.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, 72, 458.
58. ONCLEY (J.L.), GURD (F.R.N.). — *Blood Cells and plasma proteines*, Acad. Press, Ed. New York, 1953, p. 337.
59. OUCHTERLOXY (O.). — *Arkiv. Kemi. Mineral. Geolog.*, 1948, 26 B n° 14.
60. PARTRIDGE (S.M.). — *Biochem. J.*, 1948, 42, 238.
61. PEDERSEN (K.O.). — *Ultracentrifugal Studies of serum and serum fraction.* (1 vol. Uppsala, 1945. Almqvist. et Wicksells ed.) — *J. Phys. and Coll. Chem.*, 1947, 51, 156.
62. POLONOVSKI (J.). — *Ann. Chim.*, 1950, 671.
63. POLONOVSKI (J.), DOUSTE-BLAZY (L.). — *II^e Colloque International sur la biochimie des lipides*. Butterworth Scientific Path., London, 1956, p. 64.
64. POLONOVSKI (J.), JARRIER (M.). — *III^e Colloque International sur la biochimie des lipides*, Bruxelles, 1956, p. 53.
65. POLONOVSKI (J.), REBEYROTTE (P.), JARRIER (M.). — *III^e Congrès International de Transfusion Sanguine*, Bordeaux, 1955, p. 258.
66. POLONOVSKI (J.), WALD (R.), DUFOUR (C.). — *C.R. Soc. Biol.*, 1958, 152, 480.
67. REBEYROTTE (P.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1954, 36, 1617.
68. RUSS (E.M.), EDER (H.A.), BARR (D.P.). — *Am. J. Med.*, 1951, 11, 469.
69. SANDOR (G.) et SLIZEWICZ (P.). — *C.R. Ac. Sc.*, 1956, 242 1377. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1957, 39, 857.
70. SHORE (B.) et SHORE (V.E.). — *Plasma*, 1954, n° 4, 621.

71. SHORE (B.). — Arch. Bioch. Bioph., 1957, 74, 1.
 72. SMITHIES (O.). — Biochem. J., 1955, 61, 529.
 73. SÖRENSEN (M.), HAUGAARD (G.). — Biochem. Z., 1933, 260, 247.
 74. SVEDBERG (T.). — The ultracentrifuge, Clarendon Press, Oxford, 1940.
 75. SWAHN (B.). — Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1952, 44, 98 ; 1953, 5, Supplément 9.
 76. TAYEAU (F.). — C.R. Ac. Sc., 1941, 212, 575. — Ann. Biol. Clin., 1950, 8, 602.
 77. TAYEAU (F.). — C.R. Ac. Sc., 1943, 137, 239. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1944, 26, 295.
 78. TAYEAU (F.). — Exp. ann. Bioch. Med., 1955, 47, 213.
 79. TAYEAU (F.). — III^e Colloque International sur la biochimie des lipides, 1956, p. 35.
 80. TISELIUS (A.). — Trans. Faraday Soc., 1937, 33, 524.
 81. URIEL (J.) et GRABAR (P.). — Ann. Inst. Pasteur, 1956, 90, 1127.
 82. URIEL (J.) et GRABAR (P.). — Bull. Soc. Chim. Biol., 1956, 38, 1253.
-

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	7
<i>Isolement des lipoprotéines</i>	7
<i>Etat physico-chimique des lipides</i>	8
<i>Action des détergents sur les lipoprotéines</i>	9
BUT DU TRAVAIL	10
PREPARATION DE LA β -LIPOPROTEINE	11
PROPRIETES ET CONSTITUTION DE LA β -LIPOPROTEINE ISOLEE	14
ELECTROPHORÈSE.	
Electrophorèse sur papier	14
Electrophorèse en veine liquide	14
Electrophorèse sur amidon	16
Electrophorèse sur gelose	18
Etude immunologique	18
ULTRACENTRIFUGATION ANALYTIQUE.	
Détermination de la densité de la β -LP	20
Détermination de la vitesse de flottation à dilution infinie	23
COMPOSITION CHIMIQUE.	
Etude des protéines et des glucides	24
Etude des lipides	26
Séparation des divers composés lipidiques	27
<i>Séparation par couples de solvants</i>	27
<i>Séparation par chromatographie sur colonne</i>	28
STABILITE DE LA β -LIPOPROTEINE ISOLEE	30
Etude de la mobilité électrophorétique au cours du vieillissement	30
Influence de la dialyse	31
Influence de la température	32
ASSOCIATIONS MOLECULAIRES ENTRE SAVON ET LIPOPROTEINE	34
ACTION DES DÉTERGENTS SUR LA MOBILITÉ ÉLECTROPHORÉTIQUE	34
Electrophorèse sur papier	34
Electrophorèse en veine liquide	37
ETUDE DE LA VITESSE DE SÉDIMENTATION ET DE LA DENSITÉ DE LA CÉNAPSE	
LIPOPROTÉINE-SAVON	37
ETUDE DE LA LUMIÈRE DIFFUSÉE PAR LA LIPOPROTÉINE EN PRÉSENCE DU	
SAVON	38
Détermination de la masse molaire	39
Mise en évidence de la fixation de l'oléate de sodium sur la β -lipo-	
protéine	40
Interprétation des résultats	41
EXTRACTIBILITÉ DES LIPIDES PAR L'ÉTHÉR SOUS L'INFLUENCE DES SAVONS ..	43
Action de l'oléate de sodium	43
Action du zéphirol	48
INTERPRETATION ET DISCUSSION	53
CONCLUSIONS	60

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

Les "Proteolipides"

Vu et Approuvé :
Paris, le 24 juin 1959

Le Doyen de la Faculté des Sciences,
J. PERES

Vu
et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,
JEAN SARRAILH

Achevé d'imprimer le 1959.

